

CIMARA FORTES FERREIRA

**AVALIAÇÃO INCIPIENTE DA INFLUÊNCIA DO PLASMA RICO EM  
PLAQUETAS NA PROLIFERAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS -  
ESTUDO “IN VITRO”**

Florianópolis  
2004

CIMARA FORTES FERREIRA

**AVALIAÇÃO INCIPIENTE DA INFLUÊNCIA DO PLASMA RICO EM  
PLAQUETAS NA PROLIFERAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS -  
ESTUDO “IN VITRO”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção de título em Mestre em Odontologia, área de concentração: implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Co-orientador: Prof. Dr. José Scarso Filho.

Florianópolis  
2004

CIMARA FORTES FERREIRA

**AVALIAÇÃO INCIPIENTE DA INFLUÊNCIA DO PLASMA RICO EM  
PLAQUETAS NA PROLIFERAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS HUMANOS –  
ESTUDO “IN VITRO”**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de “Mestre em Odontologia”, opção Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 3 de fevereiro de 2004.

---

Prof. Dr. Mauro Amaral Caldeira de Andrada  
*Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC*

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini  
*Orientador*

---

Prof Dr. José Scarso Filho  
*Membro*

---

Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões  
*Membro*

Dedico este trabalho:

À **minha mãe**, que me guiou na busca constante da sabedoria, ensinando-me o valor da persistência, integridade e justiça.

Ao **meu pai**, que mesmo distante, sempre esteve presente no coração.

À **minha irmã Cláudia**, por ser um exemplo constante de dedicação.

Aos **meus mestres**, que abriram as portas para a minha carreira acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor co-orientador **Dr. José Scarso Filho**, pela sabedoria e prontidão em me guiar com paciência e dedicação.

Ao professor **Ricardo de Souza Magini**, pela oportunidade de poder ingressar no curso de mestrado e pelo constante incentivo e apoio.

Ao professor **Antônio Carlos Cardoso**, pelo exemplo de autenticidade, didática e sabedoria que transcende os horizontes convencionais, mostrando como ser professor.

Ao professor **José Mauro Granjeiro**, a quem sou extremamente grata pelos ensinamentos e pelo grande apoio dado, abrindo as portas de seu laboratório para aprendizagem e cedendo os osteoblastos, principal componente deste trabalho.

À professora **Cláudia Maria Oliveira Simões**, pelos ensinamentos obtidos no curso de “Cultura de Células Animais” e por disponibilizar as instalações do laboratório de Virologia Aplicada da UFSC dando apoio na metodologia e na execução da parte experimental deste trabalho.

Aos colegas de curso **Adriana Macedo Parissoto, Dircilene Colares de Souza, Gustavo dos Santos Coura, Kavio Narciso de Oliveira Castro e Octávio Magnani de Oliveira**, pela amizade e coleguismo durante esses dois anos.

À **Esther Takamori**, pela paciência e pelos ensinamento laboratoriais durante o estágio realizado no Laboratório de Bioquímica da FOB-USP, Bauru.

À **Márcia Cristina Carriel Gomes**, mestranda do Laboratório de Virologia Aplicada, com que me auxiliou na parte experimental desse trabalho, mostrando dedicação e profissionalismo transmitidos durante os curtos, mas porém, intensos meses finais deste trabalho.

À professora **Zenilda Laurita Bouzon** do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG/CCB), pela predisposição e boa vontade na realização do ensaio de imunofluorescência.

Ao **Kenneth Faulker Weaver** que me ensinou a ter paciência e calma nos momentos em que mais precisava.

À **Carla Regina Andriguetti-Fröhner**, doutoranda do Laboratório de Virologia Aplicada, que me ajudou inicialmente no trabalho laboratorial.

Às funcionárias do CEPID **Rose, Gisella e Dolores** pelo apoio, auxílio e amizade.

À funcionária **Ana Maria Vieira Frandolozo**, pela grande eficiência e empenho na pós-graduação.

FERREIRA, Cimara Fortes. **Avaliação incipiente da influência do plasma rico em plaquetas na proliferação de osteoblastos humanos: estudo “in vitro”**. 2003, 70f. Dissertação (Mestre em Odontologia, opção Implantodontia) – Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

Este trabalho avalia a ação de diferentes concentrações de PRP aplicadas em cultura celular da linhagem de osteoblasto humanos hFOB1.19 (American Tissue Culture Collection). A metodologia envolveu o teste proliferativo do ensaio do brometo de 3-[4,4-dimetiltiazol-2-4l]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). O plasma rico em plaquetas (PRP) obtido foi processado e diluído em meio de cultura a 50%, 25%, 12,5% e 6,125%. As concentrações de soro fetal bovino (SFB) foram de 0% e 10% em meio de cultura. A proliferação foi lida por densidade óptica após um intervalo de tempo de 96 h em leitor de Elisa. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que 50% de PRP adicionado ao meio de cultura para osteoblastos humanos da linhagem hFOB1.19, induziu a melhor resposta proliferativa. As concentrações de 12,5% e 6,125% de PRP não mostraram diferença estatisticamente significativa. Verificou-se que a proliferação celular obtida pelo PRP a 50% foi mais significativa, em cultura com e sem SFB, comparada com as outras diluições realizadas. Conclui-se que o PRP promove proliferação de osteoblastos e indica que não é necessário soro para indução da proliferação de osteoblastos mediada pelo PRP, sugerindo o seu uso clinicamente para otimizar procedimentos de enxertia óssea na implantodontia.

Palavras-chave: Plaquetas. Fatores de crescimento derivado de plaquetas. Implante dentário.

FERREIRA, Cimara Fortes. **Incipient Analysis of the influence of platelet-rich-plasma (PRP) in human osteoblast growth: an “in vitro” study.** 2003, 70p. Dissertation (Master in Dentistry, option Implant Dentistry) – Graduate program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis.

## **ABSTRACT**

This study evaluates the influence of different concentrations of PRP used as supplement in hFOB1.19 human osteoblast culture medium. The methodology comprehended the MTT proliferative test. The PRP obtained from a human, was diluted to 50%, 25%, 12.5% and 6.125% in culture medium with 10% of fetal bovine serum (FBS) and without FBS. The platelet rich plasma (PRP) in 12.5% and 6.125% did not show statistical significant difference when applied in culture. This investigation shows that cellular proliferation was the highest when stimulated by 50% of PRP in medium was statistically significant, when FBS was applied and wasn't applied in the culture medium, compared to the other concentrations used. This investigation used epyfluorescente microscopy to visualize the osteoblast nuclei, showing significant nuclei activity. It was concluded that the PRP promotes osteoblasts proliferation and implied that serum is not necessary for PRP mediated induction of hFOB1.19 osteoblast proliferation, suggesting its use clinically to optimize bone graft procedures in implant dentistry.

Key words: Platelet. Growth factors derived from platelets. Dental implants.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema do suporte com tubos tipo Micronic®, representando a realização da diluição seriada do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) diluído a 50% (vermelho), 25% (laranja), 12,5% (amarelo) e 6,125% (verde). Em rosa e azul, estão representados os meios de cultura contendo 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e sem SFB, respectivamente, utilizados para a diluição.....43
- Figura 2 – Resultados da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1,19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Os valores indicam a média de três experimentos independentes.....48
- Figura 3 – Resultados da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1,19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) sem Soro Fetal Bovino (SFB). Os valores indicam a média de três experimentos independentes.....51
- Figura 4 – Influência das diferentes concentrações de Plasma Rico em Plaquetas (PRP), diluído em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de soro fetal bovino (SFB) e sem SFB, com relação ao crescimento celular.....54

Figura 5 – Dispersão *Box-plot* da dispersão da influência de diferentes concentrações de Plasma Rico em Plaquetas (PRP), diluído em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de soro fetal bovino (SFB) e sem SFB, com relação ao crescimento celular.....55

Figura 6 – Osteoblastos da linhagem hFOB1.19 com núcleos celulares ativos definidos e citoplasmas amplos (100x, 20s de exposição). Células coradas com DAPI na concentração de 0,5 µg/mL. A visualização foi realizada utilizando-se o microscópio de epifluorescência (Axiostar Plus-Zeiss) com filtros de UV (46 79 60) num pico de excitação da luz de 450 a 500 nm. As fotografias foram feitas usando o filme Kodak Ectacrome ISO 400.....56

Figura 7 – Osteoblasto da linhagem hFOB1.19 com núcleo celular bastante fotossensível (100x, 20s de exposição). Células coradas com DAPI na concentração de 0,5 µg/mL. A visualização foi realizada utilizando-se o microscópio de epifluorescência (Axiostar Plus-Zeiss) com filtros de UV (46 79 60) num pico de excitação da luz de 450 a 500 nm. As fotografias foram feitas usando o filme Kodak Ectacrome ISO 400.....57

Figura 8 – Osteoblastos da linhagem hFOB1.19 apresentando morfologia citoplasmática indicativa de adesão celular (40x, 20s de exposição). Células coradas com DAPI na concentração de 0,5 µg/mL. A visualização foi realizada utilizando-se o microscópio de epifluorescência (Axiostar Plus-Zeiss) com filtros de UV (46 79 60) num pico de excitação da luz de 450 a 500 nm. As fotografias foram feitas usando o filme Kodak Ectacrome ISO 400.....57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados obtidos da estatística descritiva, da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.....	48
Tabela 2- Análise de Variância (ANOVA) e comparação múltipla de Tukey da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.....	49
Tabela 3 - Resultados da comparação múltipla de Tukey entre a influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.....	50

Tabela 4 - Dados obtidos da estatística descritiva da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) sem Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.....	51
Tabela 5: Análise de Variância (ANOVA), da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1,19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) sem Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.....	52
Tabela 6 - Resultados da comparação múltipla de Tukey entre a influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) sem Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.....	53

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1	BIOLOGIA DO SANGUE.....	16
2.2	CULTIVO DE CÉLULAS.....	18
2.3	FATORES DE CRESCIMENTO.....	19
2.4	PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	27
2.5	SUBSTÂNCIA COAGULANTE.....	34
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1	MATERIAIS.....	36
<b>4.1.1</b>	<b>Linhagem celular.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Meio de cultura.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Estufa de com CO<sub>2</sub>.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Câmara de fluxo laminar.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Microplacas.....</b>	<b>37</b>
4.2	MÉTODOS.....	38
4.2.1	Teste de proliferação celular.....	38
4.2.1.1	Crescimento e confluência celular.....	38
4.2.1.2	Plaqueamento.....	40
4.2.1.3	Obtenção do PRP.....	41
4.2.1.4	Diluição seriada.....	42
4.2.1.5	Substituição do meio de cultura pelo meio de cultura experimental.....	43

4.2.1.6	Ativação do PRP.....	44
4.2.1.7	Ensaio do MTT.....	44
<b>4.2.2</b>	<b>Espectrofotometria de varredura.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Caracterização dos osteoblastos.....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
5.1	ENSAIO DO MTT.....	47
5.1.1	Resultado do experimento quando os osteoblastos receberam 10% de SFB.....	47
5.1.2	Resultado do experimento quando os osteoblastos não receberam SFB.....	50
5.1.3	Resultado do experimento comparando os grupos que receberam 10% de SFB e que não receberam SFB.....	53
5.2	ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA.....	55
5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS OSTEOLASTOS.....	56
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIA .....</b>	<b>63</b>
	<b>GLOSSÁRIO.....</b>	<b>68</b>

## FICHA CATALOGRÁFICA

F383a Ferreira, Cimara Fortes

Avaliação incipiente da influência do plasma rico em plaquetas na proliferação de osteoblastos humanos – estudo “in vitro” / Cimara Fortes Ferreira; orientador Ricardo de Souza Magini. – Florianópolis, 2004.  
70f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2004.

Inclui bibliografia

1. Plaquetas. 2. Fatores de Crescimento derivado de plaquetas. 3. Implante dentário. I. de Souza Magini, Ricardo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU 616.314-089.843

*Catálogo na fonte por: Vera Ingrid Hobold Sovernigo CRB-14/009*





## 1 INTRODUÇÃO

Relatos científicos evidenciam o plasma rico em plaquetas (PRP), como uma estratégia terapêutica na traumatologia, ortopedia e implantodontia, para auxiliar na compactação de enxertos ósseos ou para fins hemostáticos. O uso do PRP promove a aceleração do reparo cirúrgico por meio da ação dos fatores de crescimento contidos nas plaquetas, os quais são os iniciadores universais de quase toda forma de processo de reparo (GANIO et al., 1993; TAYAPONGSAK. et al., 1994; ANITUA et al., 1999). O PRP é um material autógeno, não tóxico e que não causa reação imunológica, quando utilizado no próprio doador. O mesmo tem sido empregado com aparente sucesso clínico desde a década de 70 por Matras (1970), que utilizou vários preparos de “cola” de fibrina, substância derivada do sangue por meio de centrifugação, em reimplantes de pele de ratos. Outros estudos (KNIGHTON et al., 1990; LYNCH et al., 1991) elucidaram os efeitos benéficos do uso do PRP no reparo de úlceras cutâneas. Na cirurgia oral e maxilofacial, os seus benefícios também foram verificados (TAYAPONGSAK et al., 1994; KASSOLIS; ROSEN; REYNOLDS, 2000). Clínicos e pesquisadores têm investigado o uso de PRP na odontologia como uma forma de otimizar o mecanismo de reparo natural do corpo humano. Carlson e Roach (2002) mostraram que o PRP e os fatores de crescimento, expressos pelo concentrado de plaquetas, gel formado após a ativação do PRP, são adjuntos promissores do reparo cirúrgico. O uso de PRP, em conjunto com enxerto ósseo autógeno, foi indicado nos

procedimentos de enxertia na implantodontia, objetivando otimizar a qualidade e quantidade de osso neoformado (SCARSO FILHO, 2002). O uso de PRP baseia-se no princípio de que o plasma autógeno, rico em plaquetas, contribui com grande quantidade de polipeptídeos mitogênicos (proteínas que ativam a proliferação celular), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fatores de crescimento transformadores- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fatores de crescimento semelhantes à insulina-I (IGF-I) para a aceleração da osteogênese nos campos da cirurgia oral e maxilofacial. As plaquetas são fontes de fácil acesso de fatores de crescimento para sustentar o reparo do tecido ósseo e do tecido epitelial e conjuntivo. Marx et al. (1998) investigaram o crescimento de células tronco mesenquimais em meio de cultura suplementado com PRP e verificaram que o mesmo reduz o tempo necessário para promover a consolidação, maturação e aumento da densidade do tecido ósseo medular. Em vista da necessidade de se desenvolver um protocolo para viabilizar a cultura de osteoblastos humanos, com intuito de eliminar atos cirúrgicos de enxertia óssea convencional, envolvendo áreas doadoras extra-orais, aumentando a morbidade e o custo do procedimento, o presente estudo propõe uma base científica para estudos de otimização de procedimentos de enxertia óssea. O meio de cultura para osteoblastos humanos da linhagem hFOB1.19 foi suplementado com, PRP a 50%, 25%, 12,5% e 6,125%, objetivando verificar a percentagem que proporcionam o melhor efeito proliferativo dos mesmos. A metodologia empregada envolveu medida de absorbância por meio do ensaio do MTT modificado. Este ensaio avaliou a viabilidade celular através da capacidade das células de reduzirem o brometo de 3-[4,4-dimetiltiazol-2-4l]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a um composto de formazan azul, quantificado por espectrofotometria. Os resultados obtidos nesta investigação poderão contribuir para a base científica necessária para a otimização de um protocolo de cultivo de osteoblastos humanos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA<sup>i</sup>

A revisão de literatura realizada é uma análise comentada do que já foi escrito sobre o cultivo de osteoblastos humanos e como induzir a sua proliferação. A mesma abrange: 1) a biologia do sangue; 2) a importância do cultivo de células e como o mesmo é realizado; 3) os fatores de crescimento presentes no PRP e os seus efeitos proliferativos; 4) resultados do suplemento do PRP em meio de cultura de osteoblastos; e 5) como é feita e qual a importância da ativação do PRP.

### 2.1 BIOLOGIA DO SANGUE

O sangue é constituído de eritrócitos ou glóbulos vermelhos, leucócitos ou glóbulos brancos e plaquetas ou trombócitos. As plaquetas são responsáveis pela coagulação sanguínea. A hematopoiese, ou seja, formação dos glóbulos vermelhos, é conduzida na medula óssea, no baço e no fígado. A plaqueta é resultante da fragmentação de megacariócitos, seu antecedente medular. Este fragmento, ou a plaqueta pode apresentar um

---

<sup>i</sup> Baseado na NBR 10520: 2002 da ABNT.

diâmetro que varia de 2 a 4µm. A plaqueta ativada intumescer substancialmente, alcançando diâmetros de 25 a 50µm (NURDEN, 1977). A referência normal de plaquetas no sangue periférico é de 130 a 400mL/mm<sup>3</sup>. As plaquetas são os componentes básicos iniciadores do processo de hemostasia e coagulação do sangue. Em condições normais, elas apresentam propriedades de adesão, ativação e agregação (LENHARO et al., 2003). Durante o processo de degranulação, etapa que ocorre durante a coagulação sanguínea, muitas proteínas são liberadas, dentre elas estão os fatores de crescimento (SLATER et al., 1995), sendo os mais conhecidos o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), Fator de crescimento vascular (VEGF), Fator de crescimento fibroblástico (FGF), Fator de crescimento transformador-β (TGF-β), Fator de crescimento epitelial (EGF), Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs). A superfície plaquetária é rica em mucopolissacarídeos, material glicoprotéico e fosfolipídeos, substâncias essenciais nas funções da capacidade de adesão e agregação plaquetária. O mecanismo da coagulação envolve a emissão de pseudópodes (prolongamentos emitidos pelas células), a adesão interplaquetária e a conseqüente retração do coágulo, conferindo estabilidade e permitindo a ancoragem do citoesqueleto à rede de fibrina que, nos processos de cicatrização e recuperação tecidual, serve de “andaime” para a migração de células formadoras de novos tecidos (SANTOS; SANTOS, 2003).

## 2.2 CULTIVO DE CÉLULAS

A cultura de tecidos foi criada no início do século XX (HARRISON, 1907; CARREL, 1912) como uma ferramenta para estudar o comportamento de células animais desprovidas de variações sistêmicas, as quais podem surgir no animal, tanto durante a homeostasia normal quanto durante o estresse. A cultura celular é empregada em várias áreas de pesquisa, tais como o estudo das interações celulares e mecanismos de controle intracelular no desenvolvimento e na diferenciação celular.

Existem duas formas de se cultivar células: o cultivo primário e o cultivo secundário. A cultura primária inicia-se por células, tecidos ou órgãos coletados diretamente do organismo e antes da primeira subcultura. A subcultura geralmente implica em subdivisão da população celular em proliferação, por meio da tripsinização, originando uma linhagem celular. A tripsinização é necessária para que as células possam se descolar da base do frasco de cultura e serem transportadas para outra garrafa de crescimento celular. A subcultura é necessária quando o crescimento celular aumenta, ocupando todo o substrato. Portanto, é realizada a subcultura (uma passagem ou transferência), a caracterização e o armazenamento das células, processo do qual deriva uma linhagem celular ou cultura secundária. A cultura secundária implica na manutenção de uma cultura já isolada e caracterizada previamente. A mesma pode ser obtida de um banco de células, que é importante no auxílio da distribuição de linhagens celulares.

O meio de cultura é uma mistura de sais inorgânicos e de outros componentes capazes de sustentar a sobrevivência celular *in vitro*. O meio de cultura é acrescido de soro, o qual

repõe fatores de crescimento celular, além de outras substâncias necessárias para a sobrevivência celular. Os tipos de soro utilizados em meio de cultura são o soro fetal bovino (SFB) de cavalos ou de humanos. Embora algumas linhagens celulares necessitem de suplemento de soro no meio de cultura, existem algumas situações em que a cultura deve ser mantida sem soro. Exemplo deste sistema é quando se precisa estudar o efeito de fatores de crescimento sobre a proliferação celular. O soro fetal bovino apresenta vários fatores de crescimento, dentre eles o PDGF, que é um fator de crescimento derivado das plaquetas.

O complexo, célula e meio de cultura, é mantido em uma estufa a qual permite uma temperatura constante de 37,5°C a uma atmosfera de 5% de gás carbônico. Este ambiente é necessário, pois as culturas em baixa concentração necessitam serem incubadas em uma atmosfera contendo gás carbônico, em uma concentração que permita um equilíbrio com o bicarbonato de sódio no meio de cultura. Em concentrações celulares muito altas, não há esta necessidade de adição de gás carbônico nos frascos fechados, mas nos abertos sim, devido à capacidade do escape do composto gasoso do frasco.

## 2.3 FATORES DE CRESCIMENTO

Embora as atuais condutas clínicas envolvendo procedimentos regenerativos apresentem boas perspectivas, o extenso período de tempo necessário para a obtenção de resultados efetivos direciona a busca de novas técnicas, obtendo resultados semelhantes, em

menor período de tempo. Desse modo, objetivando acelerar o processo de reparo, biomateriais autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos são disponibilizados em associação com fatores de crescimento. O primeiro fator de crescimento foi descoberto em 1954; o fator de crescimento neural (NGF) humano, o qual foi isolado e caracterizado, posteriormente, por Greene e Shooter (1980). Outros estudos foram realizados em seqüência na procura de novos fatores de crescimento (COHEN, 1962; ARMELIN, 1973).

Posteriormente, foi descoberto, a partir das plaquetas sangüíneas humanas, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). O PDGF é uma glicoproteína liberada pelos grânulos  $\alpha$ , presentes nas plaquetas, durante o processo da coagulação. Este fenômeno é a fase hemostática em que o organismo transforma o tecido sangüíneo líquido em gel e, na seqüência, em coágulo. O PDGF exerce efeito mitogênico em células mesenquimais, fibroblastos, células da musculatura lisa dos vasos e osteoblastos, sendo que todas essas células apresentam quimiotaxia e proliferação na sua presença. Portanto, o PDGF exerce um papel importante no processo de reparo tecidual e na cicatrização de lesões (ROSS et al., 1978).

Grandes esforços já foram realizados para se controlar a proliferação celular e poucos trabalhos têm sido realizados no sentido de controlar a sobrevivência celular. No entanto, para alguns tipos de células de vertebrados, é sabido que alguns sinais de outras células são necessários para a sobrevivência celular, da mesma forma que são necessários para a proliferação e o crescimento celular (BASERGA, 1985). Na ausência dos fatores de sobrevivência, essas células parecem ativar a apoptose. Histologicamente, a apoptose é uma característica morfológica das células submetidas à morte celular programada. As células em apoptose parecem encolhidas, apresentando vesículas na membrana e fragmentação nuclear (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980). O término da morte celular programada envolve a

fragmentação das células em vesículas rodeadas por membranas contendo remanescentes celulares de proteínas e cromatina fragmentada, referida como corpos apoptóticos.

As células de mamíferos, exceto os blastômeros (BIGGERS; WHITTEN; WHITTINGHAM, 1971), são programadas para se matarem, a não ser que sejam continuamente sinalizadas por outras células para não realizarem esse ato (RAFF, 1992). Tais controles “sociais” da sobrevivência celular asseguram que as células apenas sobrevivam, quando e onde elas são solicitadas, sendo necessária a presença de fatores de crescimento, funcionando como moléculas sinalizadoras das células vizinhas, para impedir a apoptose, pelo menos em cultura.

Estudos têm mostrado a necessidade da presença dos fatores de crescimento em cultura de osteoblastos humanos derivados de explantes (tecido removido de um organismo) de tecido ósseo. Estas células, as quais acreditam representar vários estágios da linhagem osteogênica, diferem dos fibroblastos na sua característica de proliferação. Piche e Graves (2002) estudaram a necessidade dos fatores de crescimento nas culturas de osteoblastos humanos. Os osteoblastos proliferam-se no meio de cultura normal suplementado com plasma pobre em plaquetas. Quando o meio de cultura foi suplementado com PDGF, a proliferação celular aumentou (ROSS et al., 1978; ZHU et al., 2001). A investigação conduzida por Okuda et al. (2003), quando suplementaram o meio de cultura de células derivadas do periodonto com PDGF, TGF- $\beta$  e fator de crescimento derivado do endotélio (EGF), apresentou grande crescimento celular. Contrariamente, não houve proliferação dos fibroblastos semelhante ao grupo controle com 10% de soro quando se suplementou o meio de cultura com plasma pobre em plaquetas ou apenas com PDGF. Estes resultados evidenciam as diferenças nas respostas proliferativas entre as células ósseas e os fibroblastos humanos, e mostraram que os fatores



que podem ser responsáveis pela regeneração óssea, *in vivo*, podem não diferir daqueles fatores responsáveis pela regulação do reparo de lesões ósseas.

O conteúdo do PDGF presente no concentrado de plaquetas foi estudado durante o preparo e armazenamento do concentrado de plaquetas e comparado com a atividade promotora de crescimento das plaquetas na investigação conduzida por Ledent; Wasteson; Berlin (1995). O conteúdo do PDGF e do TGF- $\beta$  presente nas plaquetas foi mensurado junto com a atividade de proliferação celular. Os resultados desta investigação mostraram que o conteúdo do PDGF e do TGF- $\beta$ , presente nas plaquetas, e a atividade de promoção de crescimento das plaquetas diminuíram com o maior tempo de armazenamento. Os autores concluíram que o conteúdo de PDGF e de TGF- $\beta$  é melhor expresso em 4h a 3 dias após a coleta do sangue. Marx e Garg (1999), os quais conduziram um estudo sobre os fatores de crescimento presentes no PRP, sugeriram que todas as plaquetas fragmentam-se em torno de 3 a 5 dias de armazenamento. Adicionalmente, verificaram que a atividade dos seus fatores se extingue após 7 a 10 dias de armazenamento.

Os fatores que regulam a proliferação e o desenvolvimento de células primitivas, precursoras do tecido ósseo, não estão bem definidos. Gronthos e Simmons (1995) investigaram o crescimento, *in vitro*, de células precursoras de células do tecido ósseo do estroma de medula humana, sob condições privadas de soro. Os autores investigaram 25 fatores de crescimento recombinantes purificados quanto à sua capacidade de iniciar e sustentar a proliferação das células fibroblásticas, provindas da medula óssea humana, na formação de colônias. O controle deste estudo foi uma cultura sem SFB para que os componentes deste não mascarassem a resposta dos fatores exógenos adicionados ao meio de cultura. Os resultados deste estudo indicaram que a proliferação destas células foi

absolutamente dependente da fonte exógena de fatores de crescimento. O PDGF-bb (recombinante) e o EGF demonstraram uma maior capacidade de sustentar a proliferação celular. A formação de colônias foi concentração-dependente. Simultaneamente, a adição do PDGF-bb e do EGF, em conjunto, apresentou maior efeito proliferativo quando comparado com os fatores de crescimento suplementados ao meio de cultura isoladamente ou com o grupo controle apresentando 20% de SFB. Este estudo representou um pré-requisito importante para estudos futuros sobre a função dos fatores de crescimento na regulação da proliferação de células mesenquimais.

O PDGF é mitogênico e quimiotático para células de origem osteoblástica, *in vitro*. Este é expresso durante o reparo ósseo e estimula a formação de tecido ósseo novo, *in vivo*. O PDGF estimula as células ao se acoplar a receptores celulares específicos. O objetivo do estudo de Yu et al. (1997) foi verificar o efeito do PDGF na proliferação e diferenciação de osteoblastos em culturas de mineralização cultivadas por um longo período de tempo. Utilizando a metodologia do *Western Blot*, os investigadores perceberam que o PDGF aumenta a proliferação dos osteoblastos, mas suprime a sua diferenciação. Este mesmo estudo realizou o teste proliferativo através da incorporação de timidina tritiada, indicando que a capacidade do PDGF de estimular a síntese de DNA diminui à medida que ocorre maturação dos osteoblastos.

Kuznetsov, Friedenstein e Robey (1997) estudaram os fatores necessários para a formação de colônias de fibroblastos do mesênquima da medula óssea (FEM), *in vitro*. Os autores verificaram que os FEM são essenciais para a formação de um microambiente hematopoiético e ósseo; no entanto, pouco se sabe a respeito da sua proliferação. Este estudo promoveu o estímulo dos FEM humanos e de ratos por meio de meio de cultura condicionado sem soro (SF-CM), e os anticorpos neutralizantes contra PDGF, TGF- $\beta$ , bFGF e EGF

suprimiram a formação espécie-específica de colônias de FEM. Nas culturas humanas de FEM, nenhum dos fatores de crescimento, sozinhos ou combinados, estimularam a formação de colônias de FEM. Os resultados mostraram que houve formação de tecido ósseo pelas FEM crescidas em meio SF-CM, quando transplantados para ratos imunodeficientes, *in vivo*. Segundo os autores, os dados obtidos neste estudo, indicam que o estímulo inicial da proliferação de uma célula precursora de FEM requer a participação de pelo menos quatro fatores de crescimento: PDGF, TGF- $\beta$ , bFGF e EGF. Além disso, as células precursoras da FEM, de humanos e de camundongos, possuem diferentes exigências para cada um dos fatores de crescimento.

Com o objetivo de esclarecer a relação entre a proliferação de osteoblastos humanos e o PDGF, Nakanishi et al. (1997) cultivaram osteoblastos humanos derivados da maxila em meio de cultura suplementado com PDGF humano. O crescimento celular foi avaliado por meio da incorporação de timidina, ensaio de proliferação celular, e do *imunoensaio*, objetivando verificar síntese de DNA. Os resultados demonstraram que o PDGF estimulou a proliferação das células osteoblásticas humanas e o seu efeito foi sinérgico com a estimulação obtida pelo soro fetal bovino (SFB). A síntese do DNA realizada pelas células osteoblásticas foi elevada na presença de PDGF, de forma dose dependente, numa concentração mínima de  $1\text{ ng mL}^{-1}$ .

Devido ao grande efeito dos fatores de crescimento no metabolismo das células do tecido ósseo, Lind (1998) demonstrou os fatores de crescimento mais importantes e as suas ações, *in vivo*, e, *in vitro*. No estudo, *in vitro*, verificou os efeitos dos fatores de crescimento na quimiotaxia e no metabolismo dos osteoblastos. Estes efeitos também foram verificados no estudo, *in vivo*, com a estimulação pelo fator de crescimento da regeneração de fraturas ósseas e de tecido ósseo envolvendo implantes dentários instalados para fins protéticos. No estudo, *in*

*vitro*, vários fatores de crescimento exerceram efeitos nos osteoblastos humanos. O TGF- $\beta$  1 e o PDGF-BB (recombinante) apresentaram os efeitos quimiotáticos mais fortes, enquanto o PDGF-AA (recombinante), o IGF-1 e o IGF-2 apresentaram os efeitos quimiotáticos significativos, mas com menor intensidade nos osteoblastos humanos. O TGF- $\beta$ 1 apresentou o maior potencial quimiotático com uma atividade máxima na concentração de 100pg/mL no meio de cultura, enquanto os outros fatores de crescimento apresentaram a sua atividade máxima quando suplementados em concentrações entre 10 a 100pg/mL. Além disso, verificou que a combinação do TGF- $\beta$ 1 e do PDGF-BB mostrou forte estímulo proliferativo e quimiotático dos osteoblastos humanos. Os dados deste estudo são promissores no sentido de otimização de procedimentos de regeneração óssea.

Quatro fatores de crescimento: PDGF, FGF, fator de crescimento derivado de insulina – II (IGF-II) e TGF- $\beta$ , os quais acredita-se possuírem efeitos biológicos nas células do osso, foram examinados no estudo de Tian et al. (1999). O alvo do seu estudo foi avaliar o efeito do uso conjunto de fatores de crescimento múltiplos na proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos humanos. Os resultados mostraram que as combinações de três ou quatro fatores de crescimento estimularam a síntese de DNA, de colágeno e de fosfatase alcalina pelas células semelhantes a osteoblastos, indicando ocorrência de crescimento celular. Esses quatro fatores de crescimento interagiram sinergisticamente. Os autores sugeriram que o uso combinado dos fatores de crescimento pode ser um caminho em potencial para a reconstrução de defeitos ósseos e para o tratamento de doenças ósseas em humanos.

O fator de crescimento derivado de plaquetas é um estimulador potente do reparo de uma lesão. A terapia genética pode promover uma constante presença de fatores de

crescimento no tecido alvo, promovendo maior regeneração periodontal comparado com a aplicação local de proteínas. Zhu et al. (2001) investigaram a capacidade dos adenovirus (rAds), os quais codificam o PDGF-A ou o PDGF-1308 (um PDGF-A negativo-dominante mutante que rompe a bioatividade endógena do PDGF), em afetarem células derivadas do periodonto. Osteoblastos, fibroblastos do ligamento periodontal e fibroblastos gengivais sofreram transdução com o rAds, para que fossem avaliadas a expressão gênica, a síntese de DNA e a proliferação celular. A transdução ocorre quando o RNA presente no vírus é transformado em DNA pela célula hospedeira, fenômeno o qual permite a produção da proteína codificada pelo DNA, neste caso o fator de crescimento, permitindo manter constante a expressão desta proteína em um sítio específico. Os resultados desta investigação revelaram forte expressão do gene do PDGF-A por 7 dias seguidos da aplicação do gene. Ad2/PDGF-A otimizaram a resposta proliferativa em todos os tipos de células. Os autores concluíram que, o Ad2/PDGF pode alterar efetivamente as células derivadas do periodonto, promovendo atividade biológica equivalente à do PDGF-AA. Esses estudos corroboram com o potencial da terapia gênica para a liberação contínua do PDGF nos tecidos periodontais.

As plaquetas aceleram a regeneração, quando aplicadas junto com enxertos de tecido ósseo. Gruber et al. (2002) avaliaram o envolvimento do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), na proliferação celular. Verificaram uma resposta mitogênica das células derivadas do osso medular humano frente às plaquetas e aos sobrenadantes das plaquetas humanas ativadas por trombina. Foi notado um aumento aproximado de 50 vezes na síntese de células do tecido ósseo cultivadas na presença de plaquetas. O teste de proliferação utilizado foi a incorporação de timidina tritiada. Este teste permite que a timidina radioativa seja incorporada pelas células vitais e que a radioatividade seja lida por um leitor específico. A prevenção do contato célula-célula, feita por um filtro de membrana, não anulou o efeito

estimulador, indicando a liberação de fatores solúveis que são mitogênicos para as células do tecido ósseo. A fração lipídica das plaquetas não exerceu efeito na capacidade do DNA das células do osso incorporar a timidina tritiada. O sobrenadante liberado pelas plaquetas (SP) aumentou a taxa da incorporação da timidina-tritiada para aproximadamente 20x e reteve 56% da sua atividade após incubação em estufa de gás carbônico a 56°C e 27% a 100°C, respectivamente. A atividade mitogênica não foi restrita aos fatores de crescimento solúveis porque as micropartículas presentes no SP e as membranas das plaquetas também aumentaram a proliferação das células do tecido ósseo. Os dados deste estudo indicaram que as plaquetas nativas, o respectivo SP, as micropartículas e as membranas das plaquetas podem estimular a atividade mitogênica das células do tecido ósseo, contribuindo, dessa forma, para a regeneração dos tecidos mineralizados.

## 2.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Estudos e aplicações clínicas dos fatores de crescimento foram iniciados na ginecologia por Knighton et al. (1990). Esta investigação objetivou testar o uso da fórmula derivada de plaquetas autógenas para tratar úlceras crônicas. No grupo experimental, onde se utilizou uma fórmula derivada de plaquetas autógenas, verificou-se um tempo de epitelação de 6 a 8 semanas, enquanto no grupo controle precisou-se de 15 semanas para verificar o sucesso do tratamento. Na ortopedia, Ganio et al. (1993), também tratando úlceras crônicas de pacientes indicados para amputação de seus membros, obtiveram resultados expressivos no

final do tratamento. Os resultados do tratamento mostraram que 78% destes pacientes foram reavaliados e desconsiderados como indicação de amputação de seus membros.

Na odontologia, Anitua (2000), ao utilizar fatores de crescimento em procedimentos de enxertia óssea sugeriu que as plaquetas, como fonte exógena de fatores de crescimento, reforçam as concentrações dos fatores de crescimento já existentes, potencializando o reparo local. Whitman; Berry; Green (1997) descreveram o preparo e o uso do gel de plaquetas, evidenciando a sua característica singular de ser de origem autógena e do sangue ser coletado no período pré-operatório imediato, reduzindo o risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas. O gel de plaquetas pode ser utilizado com sucesso na área de cirurgia reconstrutora e maxilofacial e como procedimentos adjuntos da terapia por implantes.

As células osteoblásticas mostram serem sensíveis à ação proliferativa provinda de uma grande variedade de fatores de crescimento. Vários desses fatores de crescimento foram isolados de plaquetas e parecem ser liberados em sítios locais sofrendo injúria. Slater et al. (1995) conduziram um estudo sobre o envolvimento das plaquetas na estimulação da atividade osteogênica. Neste estudo, os autores avaliaram a possibilidade de um concentrado de plaqueta humana, como suplemento de meio básico, sustentar uma atividade proliferativa e funcional de células fetais humanas semelhantes a osteoblastos, tanto em cultura em curto prazo, quanto em longo prazo. No estudo em curto prazo, aplicaram o teste proliferativo de incorporação de timidina tritiada, este teste resultou no aumento em mais que 4 vezes do crescimento celular comparado com os controles suplementados com 10% de SFB. As culturas em longo prazo, tratadas com concentrado de plaquetas na concentração de 1,5% (vol/vol), em meio suplementado com SFB, apresentaram aumento na profundidade das multicamadas em até 36 vezes 30 dias após a confluência, comparado com os controles suplementados com SFB, esta diferença persistiu após 50 dias. A incorporação dos fatores de

crescimento pela matriz foi examinada por meio da microscopia imunoeletrônica de ouro coloidal. As intensidades da marcação imunológica para o fator de crescimento TGF- $\beta$ 1 foram significativamente mais baixas nas culturas tratadas com plaquetas após 20 dias e depois aumentaram em nível máximo, 2,1 vezes mais, quando comparado com os controles após 40 dias. As intensidades dos marcadores para o IGF-1 e para o FGF foram significativamente menores nas culturas tratadas com plaquetas, comparado com os controles em todos os estágios de cultivo. Os autores concluíram que o concentrado de plaquetas promoveu aumento proliferativo significativo nas culturas de células fetais humanas semelhantes a osteoblastos.

Sabendo da dificuldade do estabelecimento de culturas primárias (capacidade de proliferar e cultivar, *in vitro*, células de explantes), Van Griensven et al. (2002) modificaram o meio de cultura para osteoblastos humanos adicionando cola de fibrina, objetivando desenvolver métodos mais confiáveis para o cultivo de osteoblastos humanos; evidenciando um outro método de cultivo de osteoblastos humanos utilizando um derivado do plasma sanguíneo. A metodologia deste estudo envolveu a obtenção de espécimes, de tecido ósseo, obtidos de 20 pacientes sendo submetidos a procedimentos cirúrgicos reconstrutivos. Os espécimes foram dissecados e colocados em placas de Petri contendo cola de fibrina em sua base. As células foram coradas citologicamente para que a sua natureza osteoblástica fosse avaliada. O tempo médio de crescimento celular foi de 12 dias após o preparo do espécime de osso. Após aproximadamente 4 a 5 semanas a confluência da cultura celular foi atingida. Os resultados desta investigação mostraram que todas as células responderam positivamente aos corantes específicos para tecido ósseo. Os autores concluíram que o método proposto é um método simplificado para o cultivo de osteoblastos provindos de qualquer tipo de espécime do tecido ósseo utilizando a placa de Petri. Este método permite que as células de origem óssea



cresçam sem interrupções. Normalmente, durante os movimentos que ocorrem durante as trocas do meio de cultura, as ligações adesivas são rompidas. A cola de fibrina mantém as ligações adesivas entre os osteoblastos. Este método permite o estudo de cultura de osteoblastos em diferentes condições clínicas.

As plaquetas contêm diferentes fatores de crescimento. O seu uso potencial para otimizar procedimentos de regeneração óssea tem sido alvo de atuais discussões. Dados básicos sobre o efeito biológico do PRP ainda são poucos na literatura. Weibrich et al. (2002) realizaram uma análise, *in vitro*, do efeito do PRP na proliferação de células semelhantes a osteoblastos humanos (CSOH). As CSOH foram estimuladas com diferentes diluições de plaquetas (de 0 a 1,700,000 plaquetas/ $\mu$ L) suplementadas em meio de cultura. Passados 3 dias, aplicaram o teste WST (Roche Diagnostics), objetivando mensurar a atividade mitocondrial e a proliferação celular. Os resultados indicaram que a proliferação celular das CSOH foi dependente da diluição das plaquetas no meio de cultura, aumentando até um certo platô à medida que as plaquetas foram adicionadas, alcançando um ponto em que não se atingia aumento proliferativo ao se aumentar a quantidade de plaquetas. A análise estatística indicou diferenças significativas nas diferentes concentrações de plaquetas testadas ( $p < 0.001$ ). Os autores concluíram que as CSOH podem ser estimuladas, *in vitro*, por concentrados de plaquetas de forma dose dependente. Este resultado, *in vitro*, sustenta a suposição atualmente discutida de que o uso clínico do PRP pode aumentar a regeneração óssea.

As concentrações dos fatores de crescimento no plasma rico em plaquetas ainda não foram especificamente determinadas e os efeitos biológicos do PRP em nível celular e molecular ainda não foram determinados. No entanto, Kawase et al. (2003) avaliaram o estímulo da síntese de colágeno no ligamento periodontal (CLP) e nas células de origem

osteoblástica (MG63), *in vitro*. A metodologia deste estudo abordou o preparo do PRP com o plasma obtido do sangue autólogo de voluntários saudáveis e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até seu uso. As células tratadas com PRP de 0,5% a 2%, foram coradas imunohistologicamente para colágeno tipo I e fibrina e a viscosidade do meio de cultura foi avaliada visualmente. O fibrinogênio presente no PRP foi detectado pelo imunoensaio, enquanto a expressão da trombina endógena nas células foi detectada pelo ensaio de imunoabsorção modificado. Os resultados deste estudo mostraram uma rápida formação de gel (menos que 30 min) nas culturas ou de CLP ou de MG63 após a adição de PRP em concentração maior ou igual a 0,5%. O PRP modificou a morfologia da célula e aumentou a concentração de colágeno tipo I após 24h. O fibrinogênio foi detectado nos preparos de PRP e redes insolúveis de fibrina foram encontradas no material recém-geleificado. A ação do PRP na síntese de colágeno foi mimetizada pelo fibrinogênio purificado e bloqueada por um inibidor de trombina. Os autores concluíram que o material, semelhante a gel, formado na cultura celular é coágulo de fibrina, o qual é capaz de aumentar a síntese de colágeno presente na matriz extracelular. Pelos dados deste estudo os autores sugeriram a possibilidade do fibrinogênio, convertido a fibrina e combinado aos fatores de crescimento presentes no PRP, poder promover efetivamente o reparo em sítios lesionados do tecido periodontal.

O PRP é uma fração do plasma em que se acredita estar concentrado os fatores de crescimento PDGF e TGF- $\beta$ . Portanto, as concentrações destes fatores de crescimento presentes no PRP ainda não foram especificamente determinadas junto com o seu efeito biológico em nível celular. Okuda et al. (2003) avaliaram a modulação da proliferação de células derivadas do periodonto, *in vitro*, pelo PRP. A metodologia envolveu a obtenção do PRP de indivíduos saudáveis e o seu preparo por meio de centrifugação do plasma, o qual foi imediatamente submetido à avaliação para detecção do PDGF-AB e TGF- $\beta$ 1 por meio de kits

de ensaio de imunoabsorbância com ligação a enzima (ELISA-Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Os efeitos biológicos do PRP foram avaliados em fibroblastos, osteoblastos e células epiteliais derivadas do ligamento periodontal. A atividade mitogênica das células foi avaliada pela contagem celular ou pela incorporação de 5-bromodeoxiuridina (BrdU). Os resultados mostraram correlações significativas entre a contagem de plaquetas e os níveis de fatores de crescimento. O PRP estimulou a síntese de DNA dos osteoblastos e a mitose celular, mas suprimiu a divisão das células epiteliais e fibroblásticas do ligamento periodontal. Os autores concluíram que tanto o PDGF-AB quanto o TGF- $\beta$ 1 estavam em altas concentrações no PRP, sugerindo que o mesmo modula a proliferação celular de forma sincronizada, possuindo uma ação benéfica na terapia regenerativa do periodonto.

Os estudos de novos procedimentos para reconstruções ósseas sugerem que as células autógenas, semeadas num arcabouço absorvível, podem otimizar o tratamento de defeitos ósseos. É importante desenvolver as condições de cultura para as expansões celulares *ex vivo* das células tronco mesenquimais (CTM) que não comprometam a sua capacidade de renovação e diferenciação. Lucarelli et al. (2003) conduziram um trabalho objetivando otimizar a proliferação de células tronco mesenquimais com fatores de crescimento derivados do PRP. As CTM providas da medula óssea e o gel de plaquetas (GP), obtidos pelo PRP, fornecem uma fonte valiosa de células progenitoras autógenas e de fatores de crescimento para reconstruções ósseas. Os autores investigaram neste estudo o efeito do plasma rico em plaquetas, liberado pelo gel de plaquetas, na proliferação e diferenciação das CTM. O efeito registrado neste estudo foi dose dependente, mostrando que 10% de PRP é suficiente para induzir uma evidente proliferação celular. As células não tratadas serviram como controle. No tratamento com 10% de PRP, as células entraram na fase de crescimento logarítmico. A remoção do PRP recuperou a taxa de proliferação característica. Pelo fato das CTM perderem

gradualmente a sua capacidade de diferenciação, no caminho em direção à linhagem celular que origina tecido ósseo e tecido cartilaginoso, durante a subcultura, *in vitro*, os autores testaram se 10% de PRP afetava a capacidade de mineralização das CTM. As CTM foram primeiramente expostas ao PRP após a quinta passagem, ou após a quinta vez em que a cultura foi subcultivada, na sexta passagem o PRP foi lavado e as células plaqueadas foram tratadas com dexametasona. A dexametasona induziu um aumento em três vezes no número de células coradas com fosfatase alcalina e induziu mineralização que é consistente com a diferenciação das células progenitoras do tecido ósseo e do tecido cartilaginoso. Os autores concluíram que 10% de PRP promove proliferação das CTM. Estas células expandidas com 10% de PRP podem mineralizar a matriz extracelular após a remoção do PRP.

Existem alternativas de materiais para enxertos ósseos como, materiais alógenos e xenógenos. Estes materiais exigem um rigoroso processamento laboratorial, sendo sujeitos a uma elevada dificuldade de controle de qualidade final dos produtos. Estes produtos apresentam a desvantagem de poderem ou não estimular a formação óssea no local enxertado, estímulo o qual depende dos mecanismos de reparo e da aceitação do organismo receptor (BUSER et al., 1995).

Carlson e Roach (2002), estudando as aplicações clínicas do PRP na odontologia, sugeriram que o PRP é efetivo na otimização de resultados cirúrgicos numa variedade de procedimentos no campo da cirurgia oral e maxilofacial. Como perspectivas futuras o PRP é uma nova modalidade de tratamento que pode ser oferecida ao indivíduo necessitando de procedimentos cirúrgicos envolvendo enxertia óssea.

## 2.5 SUBSTÂNCIA COAGULANTE

As substâncias que podem ser utilizadas para permitir a formação do gel de plaquetas são: a trombina bovina, o cloreto de cálcio e o gluconato de cálcio, dentre outras já estudadas. A trombina bovina, com o passar dos anos, foi substituída pelo cloreto de cálcio ou gluconato de cálcio, pois a mesma pode transmitir a encefalopatia bovina esponjiforme (SOGAL; TOFE, 1999) ao entrar na corrente sanguínea de um indivíduo. O trabalho de Ramesh et al. (1990), abordando os efeitos dos pró-coagulantes no reparo da lesão cirúrgica, mostrou que os agentes coagulantes modificam o processo de reparo de sítios comprometidos, e os autores afirmaram que a trombina retarda o processo de contração da lesão cirúrgica. Adicionalmente, alguns autores mostram preferência pelo uso de protocolos livres de trombina bovina (MARX; GARG; 2003). Portanto, o protocolo utilizado no presente trabalho, o qual foi desenvolvido no Centro de Estudos e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID) (MACEDO et al., 2003), envolve a ativação do PRP, para a formação do gel de plaquetas, com o cloreto de cálcio, embora ainda existam trabalhos na literatura que apresentem o uso da trombina bovina (MARX; GARG, 1999; MARX, 2000).

### **3 PROPOSIÇÃO**

Existe uma grande dificuldade no cultivo de células da linhagem osteogênica (LIND, 1998). Sabendo da presença de fatores de crescimento no PRP, o estudo proposto neste trabalho utilizou o PRP como suplemento do meio de cultura de osteoblastos humanos da linhagem hFOB1.19, objetivando otimizar a proliferação celular.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAIS**

#### **4.1.1 Linhagem celular**

Foram utilizadas células humanas da linhagem hFOB1.19 (CRL – 113372) providas do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru de São Paulo (FOB-USP). Esta linhagem foi cultivada seguindo a metodologia estabelecida pela American Type Culture Collection (ATCC) com algumas modificações.

#### **4.1.2 Meio de cultura**

O meio de cultura preconizado pela ATCC para cultivo de osteoblastos hFOB1.19 é uma mistura do HAM F-12 (CULTILAB, Campinas, São Paulo) com o Meio Mínimo de Eagle (MEM) (Gibco – Invitrogen Corporation, USA), na proporção de 1:1. À este meio adicionou-se soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen Corporation, USA) a 10% e utilizou-se 1% da mistura de antibióticos e antifúngico (10.000 U/mL de penicilina G sódica, 10.000µg/mL de sulfato de estreptomicina e 25µg/mL de anfotericina B (Gibco - Invitrogen

Coorporation, USA). A modificação realizada no meio de cultura foi no uso do MEM (Meio de Eagle com o Mínimo de Essencial para o cultivo celular) (Sigma Chemical Co, USA) ao invés do Meio de Eagle, com o Mínimo de Essencial para cultivo celular, Modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco - Invitrogen Coorporation, USA). Isto ocorreu devido às condições do Laboratório de Virologia Aplicada, onde foi realizado este trabalho, e em consonância com o meio utilizado por Lucarelli et al. (2003) para cultivo de osteoblastos humanos, onde foi realizado este trabalho. O meio de cultura DMEM apresenta o sal inorgânico  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , a vitamina piroxidina HCl e o composto piruvato de sódio em adicional aos componentes presentes no meio de cultura MEM.

#### **4.1.3 Estufa de CO<sub>2</sub>**

Todo o crescimento celular foi realizado em estufa com gás carbônico (NUAIRE<sup>TM</sup> US Auto flow CO<sub>2</sub> water – jacketed Incubator, USA), a qual apresenta controle da temperatura a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico, condições vitais para o desenvolvimento e crescimento celular.

#### **4.1.4 Câmara de fluxo laminar**

Todos os procedimentos envolvendo a manipulação de células e diluição do PRP foram realizados dentro da câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, usando material



estéril, com temperatura ambiente variando entre 25 e 28°C. Seguiu-se o protocolo de uso do fluxo laminar, o qual compreende acionar o sistema de exaustão durante 15min e em seguida acionar a luz ultravioleta por mais 15min antes de proceder aos experimentos e as trocas de meio de cultura. Todos os instrumentais e materiais utilizados dentro da câmara de fluxo laminar sofreram anti-sepsia prévia com álcool a 70%.

#### **4.1.5 Microplacas**

A avaliação da proliferação celular foi realizada em microplacas (BD Falcon™ 96-well Elisa plate, Biosciences, USA) estéreis de 96 poços, em forma cilíndrica com a base reta, com altura de 10,9mm e diâmetro superior de 6,96mm e o inferior de 6,58mm, permitindo um volume máximo de 300µL.

### **4.2 MÉTODOS**

#### **4.2.1 Teste de proliferação celular**

##### **4.2.1.1 Crescimento e confluência celular**

As células hFOB1.19 foram recebidas na passagem 4 e o experimento foi realizado na passagem 6. O frasco de cultura foi devidamente datado, identificado e incubado a 37°C, em

atmosfera com 5% de gás carbônico até alcançar a subconfluência (de 70% a 80% da base do frasco revestido por células) dos osteoblastos. As células foram monitoradas com auxílio do microscópio óptico de fase invertida (Olympus, Biosystems).

Após alcançar a subconfluência celular, o meio de cultura foi renovado a cada 3 dias. A renovação do meio de cultura envolveu o transporte da garrafa de crescimento celular (FIG. 1) para a cabine de fluxo laminar, o descarte do meio de cultura por meio de aspiração a vácuo, com auxílio da pipeta Pasteur, a lavagem das células 3x com tampão PBS e a adição de meio de cultura fresco (FRESHNEY, 2000).

Quando foi alcançada a subconfluência, as células foram subcultivadas, ou seja, sofreram passagem de uma garrafa para outra, com auxílio de uma enzima para realizar a digestão da matriz intercelular (tripsinização). A matriz intercelular une as células umas às outras e à superfície interna da garrafa de cultura. Portanto, para que as células possam se descolar da base do frasco de cultura, e também se descolar uma das outras para serem transportadas para outra garrafa de crescimento celular, as mesmas devem sofrer tripsinização. Este procedimento envolveu o transporte da garrafa de cultura para uma cabine de fluxo laminar, o descarte do meio de cultura através de aspiração a vácuo, com auxílio da pipeta de Pasteur, a lavagem das células 3x com PBS, o descarte desta solução e a adição de 500µL de tripsina suína (tripsina 1:250 de pâncreas suínos, Sigma Chemical Co. USA). Após a adição da tripsina, a garrafa foi transferida para a incubadora de gás carbônico, por 5min. Realizou-se movimento de golpe na região lateral da garrafa para ajudá-las a se descolarem do fundo da mesma. Em seguida, as células são aspiradas, com auxílio de uma pipeta de Pasteur tamponada com algodão, e transferidas para outra garrafa de cultura. A garrafa original recebe novo meio de cultura e também é incubada em estufa de gás carbônico.

#### 4.2.1.2 Plaqueamento

Antes de iniciar o plaqueamento, todas as substâncias que entraram em contato com as células foram pré-aquecidas em banho-maria (Modelo 100 FANEM Ltda ®, São Paulo), a 37°C, por 15min. Iniciou-se o processo de plaqueamento com a tripsinização de duas garrafas de células quando atingida a subconfluência celular. As duas placas foram utilizadas para o plaqueamento de células em meios de cultura com 0% e 10% de SFB. As suspensões celulares com  $3 \times 10^5$  células/ mL, e que não receberam o PRP diluído no meio de cultura, com 10% de SFB ou sem SFB, foram utilizadas como controles. O meio de cultura com 10% de SFB foi utilizado para a análise do efeito proliferativo no meio de cultura considerado padrão e, desta forma, verificar a ação adicional do PRP na proliferação celular. O meio de cultura com 0% de SFB foi utilizado para a análise do efeito proliferativo exercido apenas pelo PRP e, desta forma, verificar apenas a ação do PRP na proliferação celular. O plaqueamento envolveu a adição de 200µl de suspensão celular /cavidade (FROST et al., 2001). A contagem celular foi realizada na câmara de Neubauer. Contou-se 5 quadrantes da porção superior e 5 da porção inferior da câmara de Neubauer, obtendo um valor, o qual foi dividido por 10 para obter-se a média. Este valor simboliza a quantidade de células na quarta potência numa solução de 1mL (FRESHNEY, 2000). Portanto, aplicou-se a regra de três para obter-se o valor necessário de células em cada poço. Após o plaqueamento as células foram mantidas em meio de cultura durante 24h. O experimento foi realizado em triplicata, em 3 dias diferentes.

#### 4.2.1.3 Obtenção do PRP

Vinte-e-quatro horas após o plaqueamento realizou-se a coleta do sangue de uma voluntária saudável. O pré-requisito para a participação nesta pesquisa foi apresentar alguns parâmetros sanguíneos em níveis normais, a saber: a) hemograma completo; b) glicose; c) tempo de coagulação; d) tempo parcial de tromboplastina; e e) marcadores para hepatites A, B e C. O protocolo utilizado para a obtenção do PRP foi o desenvolvido no CEPID-UFSC (MACEDO et al., 2003). Este protocolo abrange a coleta de 60mL de sangue em tubos *vacutainer* de 5mL (6 tubos) contendo 0,5mL de citrato de sódio.

Os tubos foram centrifugados a 1200rpm durante 10min utilizando a centrífuga ALC (Centrifugette 4206 ALC, ACE Surgical Supply Company Inc, Brockton, MA, USA) com raio de 10cm. Após a primeira centrifugação os tubos apresentaram 2 fases, a fase contendo as hemáceas, de cor vermelha, e a fase contendo o plasma, de cor amarela.

Neste ponto, o plasma sobrenadante foi aspirado, com auxílio de micropipetas, calibradas de 1 para 100µL e de 1 para 1000µL, e transferido para outro tubo estéril sem citrato de sódio. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1200rpm por 10min. O resultado desta etapa foi uma fase amarelada apresentando 50% da porção inferior do tubo representado pelo plasma rico em plaquetas e 50% da porção superior do tubo representado pelo plasma pobre em plaquetas. A porção superior do conteúdo do tubo foi eliminada e a porção inferior foi coletada com auxílio de micropipetas. Este conteúdo foi transportado imediatamente para o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, em temperatura ambiente, dando continuidade ao experimento. O período de tempo entre a coleta do sangue, o seu processamento, o seu

transporte para o laboratório e a realização do experimento foi de 3h, tempo considerado ideal para a obtenção dos melhores resultados proliferativos (LEDENT; WASTESON; BERLIN, 1995). A próxima etapa envolveu a diluição seriada do PRP.

#### 4.2.1.4 Diluição seriada do PRP

O PRP foi diluído na razão 1:2 no meio de cultura, com 0% ou 10% de SFB, em tubos tipo Micronics® (FIG. 1). Foram adicionados 200µL de meio de cultura com 10% de SFB, nos tubos 4 e 5-B a H e 200µL de meio de cultura sem SFB nos tubos 6 e 7-B a H. Adicionou-se 200µL de PRP nos tubos 4B a 7B, os quais estavam preenchidos com meio de cultura. Em seguida, realizou-se a homogeneização da solução, aspirando e depositando a solução 5 vezes. Este procedimento permitiu a obtenção de uma solução com 50% de PRP. Desta solução removeu-se 200µL de cada tubo, os quais foram adicionados nos tubos da fileira C, obtendo-se uma solução com 25% de PRP. Após homogeneização desta solução, removeu-se 200 µL de cada tubo, os quais foram adicionados nos tubos da fileira D, obtendo-se uma solução com 12,5% de PRP. Finalmente, desta solução removeu-se 200µL de cada nos tubos, os quais foram adicionados nos tubos da fileira E, obtendo-se uma solução com 6,125% de PRP.

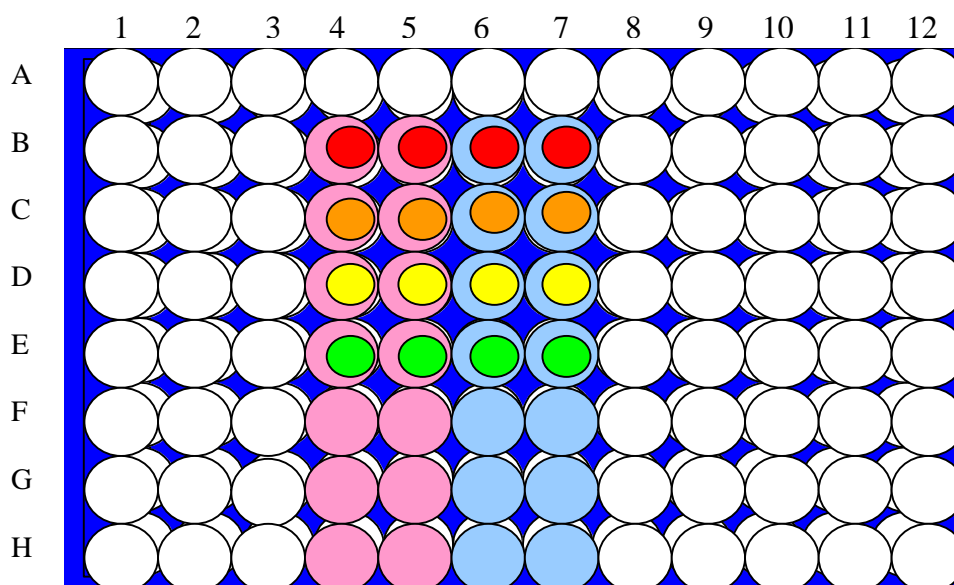


Figura 1 – Esquema do suporte com tubos tipo Micronic®, representando a realização da diluição seriada do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) diluído a 50% (vermelho), 25% (laranja), 12,5% (amarelo) e 6,125% (verde). Em rosa e azul, estão representados os meios de cultura contendo 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e sem SFB, respectivamente, utilizados para a diluição.

#### 4.2.1.5 Substituição do meio de cultura pelo meio de cultura experimental

A placa semeada com os osteoblastos foi incubada durante 24h até a obtenção do tapete celular. Após este período, a mesma foi removida da estufa e a parte experimental foi iniciada. O meio de cultura foi removido através de bomba à vácuo, com auxílio da pipeta de Pasteur. Transferiu-se 140µL do meio de cultura experimental, como explicado no item anterior, para os seus respectivos poços da placa de 96 poços. Em seguida, foi realizada a ativação do PRP.

#### 4.2.1.6 Ativação do PRP

A ativação do PRP requer a adição de uma substância coagulante na concentração de 4% (ANITUA, 1999). Após, a placa foi incubada durante 4 dias, conforme determinado por Huang et al. (2002) e Okuda et al. (2003). Após este período de tempo, foi realizado o teste de proliferação celular, através do ensaio colorimétrico com MTT.

#### 4.2.1.7 Ensaio do MTT

O ensaio do MTT é um método clássico, preconizado por Mossman (1983), o qual se baseia na determinação da proliferação celular por meio da medida da capacidade das células em reduzirem os sais de tetrazólio a um composto de formazan. Essa redução é promovida pela succinato desidrogenase, enzima presente nas mitocôndrias de células viáveis e, desta forma, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis.

A metodologia deste ensaio envolveu a adição de 50µL de uma solução de MTT (Sigma Chemical Corporation, USA), na concentração de 1mg/mL diluída em meio de cultura HAM:MEM (na proporção de 1:1), em cada uma das cavidades. Em seguida, a placa foi colocada em estufa de CO<sub>2</sub>, durante 4h, a 37°C (FRESHNEY, 2000; TORRICELLI et al., 2003; LUCARELLI et al., 2003). A metodologia preconizada envolve o descarte deste sobrenadante, a adição de 100µl de DMSO para dissolver os cristais azuis escuros de formazan e leve agitação da placa por 10min. Em seguida a leitura da absorbância é realizada em espectrofotômetro a 540nm. Neste trabalho, esta metodologia foi modificada: o meio de

cultura e a solução de MTT não foram descartados devido à propensão do gel de plaquetas permitir migração e adesão celular nas suas próprias redes de fibrina (VAN GRIESVEN et al., 2002). O branco da placa, referente à primeira fileira não utilizada até então, recebeu 100µL de DMSO e 50µL de solução de MTT, para que o espectrofotômetro, já programado, subtraísse estes valores no momento da leitura. Ao aplicar o método convencional, ou seja, ao remover o PRP, as células aderidas nas redes de fibrina também seriam removidas, resultando na leitura insuficiente de crescimento celular. Desta forma, o gel de plaquetas presente nos poços não foi perturbado, pois não houve aspiração das células que se aderiram em suas redes de fibrina. Um controle foi realizado apenas com o PRP diluído nas quatro concentrações e sem células, apenas para verificarmos o efeito da interferência do PRP na leitura realizada pelo aparelho. Este efeito foi subtraído das absorbâncias lidas nas cavidades contendo as respectivas concentrações de PRP. Este procedimento permitiu que os resultados obtidos através da leitura, realizada em leitor tipo ELISA (EL<sub>x</sub> 800 – Biotek Instruments, Inc.), fossem mais coerentes. O ensaio do MTT foi realizado em triplicata, em três placas diferentes e em dias diferentes.

#### **4.2.2 Espectrofotometria de varredura**

Outra questão a ser abordada foi o estabelecimento de uma suposta influência do PRP na leitura realizada. Para tal, realizou-se a espectrofotometria de varredura do PRP, nas concentrações utilizadas nesta investigação. Com auxílio do espectrofotômetro *Ultrospec* 3000 (Pharmacia Bio-tek, Canadá), o qual permite visibilidade na faixa da absorção da luz ultravioleta, realizou-se varredura da absorbância do PRP a cada 10nm, iniciou-se a 200nm e



terminando a 750nm, para localizar os picos de influência do PRP numa faixa que compreende a absorbância de 540nm, na qual foi realizado o ensaio do MTT. Para obter as leituras da influência do PRP a 50%, 25%, 12,5% e 6,125% no meio de cultura sem soro fetal bovino, o mesmo foi submetido a todos os procedimentos realizados para o ensaio do MTT, conforme descrito anteriormente. Isto é, após a incubação da placa em estufa de CO<sub>2</sub> por 4 dias, adicionou-se 50µL da solução de MTT, e a placa foi incubada por 4h. Após este período, adicionou-se 100µL de DMSO e a leitura foi realizada.

#### **4.2.3 Caracterização dos osteoblastos**

Para a caracterização morfológica e da atividade nuclear dos osteoblastos, a cultura celular foi avaliada de acordo com a metodologia preconizada por Terui, Suzuki e Takahashi (1995) modificada. Esta etapa do trabalho foi realizada no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG) do Centro de Ciências Biológicas da UFSC. Aplicou-se o corante fluorescente 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), o qual é utilizado em preparações citológicas no estudo de núcleo celular. As células foram fixadas com paraformaldeído a 2% em tampão de fosfato por 10min. Em seguida, foram lavadas 2 vezes com tampão fosfato, durante 10min, e coradas com DAPI na concentração de 0,5 µg ml<sup>-1</sup>. Em seguida, a visualização foi realizada utilizando-se o microscópio de epifluorescência (Axiostar Plus-Zeiss) com filtros de UV (46 79 60) num pico de excitação da luz de 450 a 500 nm. As fotografias foram feitas usando o filme Kodak Ectacrome ISO 400.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ENSAIO DO MTT

#### 5.1.1 Resultados do experimento quando os osteoblastos receberam 10% de SFB.

Os resultados da influência de diferentes concentrações do PRP no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1,19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de SFB. Os valores percentuais indicam a média de três experimentos independentes (FIG. 2).

Foi aplicado o modelo estatístico paramétrico, Análise de Variância (ANOVA), para verificar se houve diferença estatística dos resultados obtidos nos grupos experimentais que receberam 10% de SFB no meio de cultura. Os dados obtidos neste grupo foram estatisticamente significativos quando aplicou-se o teste de Tukey, que coloca à prova a hipótese de igualdade de variâncias entre os grupos. Os dados da estatística descritiva por grupos em percentagem de crescimento celular estão representados na TAB. 1. A percentagem de crescimento celular foi obtida após aplicar-se a fórmula abaixo para cada dado de absorbância obtido nos experimentos:  $\% \text{ Crescimento celular} = \frac{\text{Absorbância} \times 100}{\text{Média do Controle Celular}}$ .

A TAB. 2 é uma comparação entre os grupos estudados, ANOVA e comparação

múltipla de Tukey da influência de diferentes concentrações do PRP no crescimento de osteoblastos hFOB1.19. A FIG. 2 apresenta os dados obtidos da percentagem de crescimento celular dos quatro grupos que receberam 10% de SFB.

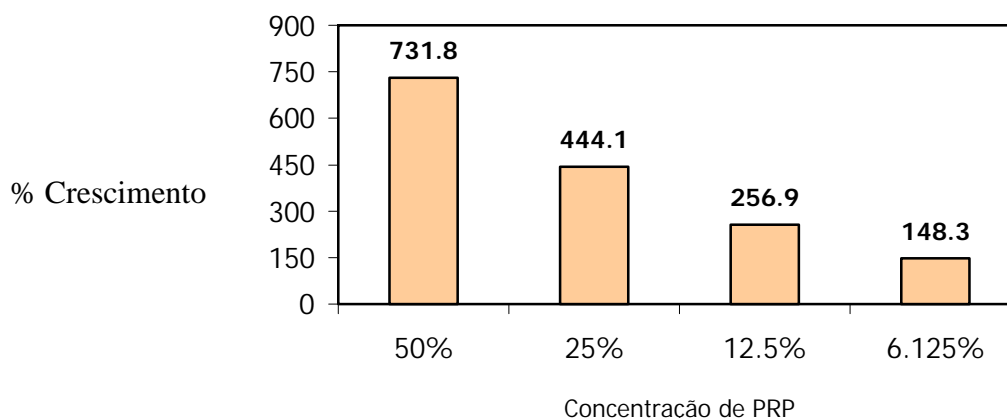


Figura 2 – Resultados da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Os valores indicam a média de três experimentos independentes.

Tabela 1- Dados obtidos da estatística descritiva, da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.

Concentração (%)	Total Amostra	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	CV <sup>(1)</sup>
50	3	695,7	731,8	80,5	675,7	824,0	11,0
25	3	422,0	444,1	40,1	420,1	490,4	9,0
12,5	3	230,0	256,9	46,6	230,0	310,8	18,2
6,125	3	153,0	148,3	35,9	110,2	181,5	24,2

<sup>(1)</sup> Coeficiente de Variação é uma medida de dispersão que calcula o quanto o valor do desvio padrão (a dispersão) está afastado em relação à média. É o valor do desvio padrão dividido pela média.

Tabela 2- Análise de Variância (ANOVA) e comparação múltipla de Tukey da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Soma de Quadrados Médios	F	Valor p	resultado
Modelo	3	587359,22	195786,41			
Erro	8	23082,22	2885,28	67,86	<0,0001	Rejeita H <sub>0</sub>
Total	11	610441,44				

A hipótese testada foi: 1) H<sub>0</sub>: Não há diferença entre as concentrações médias observadas e 2) H<sub>1</sub>: Existe diferença entre as concentrações. Os resultados estão representados na TAB. 2. A conclusão estatística da ANOVA rejeita a hipótese de igualdade entre as concentrações médias observadas, para o grupo experimental com 10% de SFB. Existe diferença estatística significativa entre as diferentes concentrações segundo a porcentagem de crescimento celular. O resultado da comparação múltipla de Tukey: (para grupos com a letra b, não foi observada diferença estatística entre as médias) (TAB.3). Conclusão estatística: Existe diferença entre as concentrações do grupo experimental com 10% de SFB. A concentração que mais contribuiu para o crescimento celular, em média, foi a concentração de 50%. A concentração de 25% teve uma contribuição mediana. A menor contribuição para o crescimento celular foi as concentrações que não tiveram diferença estatística significativa, as concentrações de 12,5% e 6,125%.

Tabela 3 - Resultados da comparação múltipla de Tukey entre a influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.

<b>Concentração (%)</b>	<b>Média do Crescimento celular (%)</b>
50	731,8 a
25	444,1 c
12,5	256,9 b
6,125	148,3 b

Letras iguais Significa que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias.

### **5.1.2 Resultados do experimento quando os osteoblastos não receberam SFB.**

Nos grupos que não receberão SFB o teste ANOVA foi aplicado. Os resultados de crescimento celular estão apresentados pela TAB. 4 e pelo FIG. 3, para o PRP a 50%, 25%, 12,5% e 6,125%, respectivamente. A estatística descritiva esta representada na TAB. 5. Os dados obtidos neste estudo estão representados na TAB. 4.

Tabela 4 - Dados obtidos da estatística descritiva da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) sem Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.

Concentração (%)	Total Amostra	Mediana	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	CV <sup>(1)</sup>
50	3	684,5	666,4	35,3	625,8	688,9	5,3%
25	3	445,1	433,5	55,3	373,3	482,1	12,8%
12,5	3	207,9	191,2	35,7	150,2	215,5	18,7%
6,125	3	116,4	116,1	18,0	97,9	133,9	15,5%

<sup>(1)</sup> Coeficiente de Variação é uma medida de dispersão que calcula o quanto o valor do desvio padrão (a dispersão) está afastado em relação à média. É o valor do desvio padrão dividido pela média.

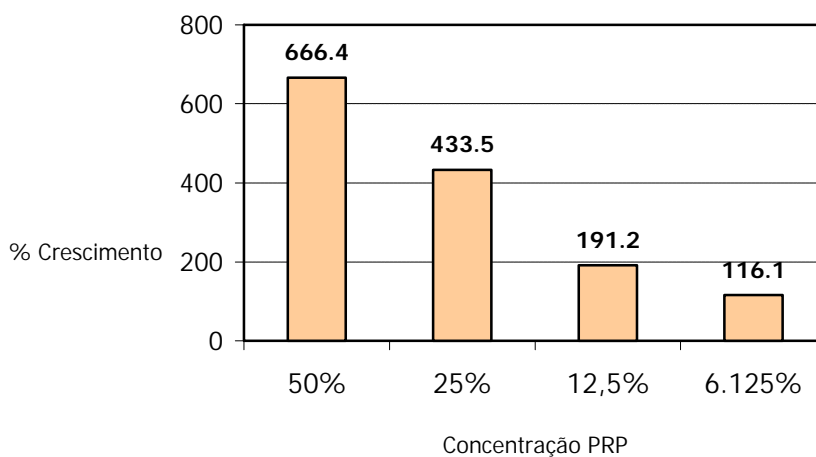


Figura 3 – Resultados da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) sem Soro Fetal Bovino (SFB). Os valores indicam a média de três experimentos independentes.

Aplicou-se o teste de comparação entre os grupos estudados, ANOVA e comparação múltipla de Tukey. Aplicou-se o teste para a igualdade de várias médias, ANOVA (Análise da Variância). Sendo a diferença entre as médias significativa, aplicou-se o teste de comparação múltipla de TUKEY para verificar estas diferenças. A hipótese inicial ( $H_0$ ) é de igualdade entre as concentrações consideradas, ou seja, não existe diferença estatística entre as concentrações para o experimento sem SFB. A hipótese alternativa ( $H_1$ ) é de que existe diferença entre as concentrações. O teste é aplicado em um nível de 5% de significância (p-value). Assim, se o valor de significância (p-value) for menor que 5% (0,05) a hipótese inicial será rejeitada, ou seja, a probabilidade de rejeitarmos a hipótese inicial, sendo ela verdadeira (causando um erro na decisão de hipótese chamado “erro tipo I”), deve ser menor que 5%.

Os resultados da ANOVA estão representados na TAB. 5. Os resultados da comparação múltipla de Tukey estão representados na TAB. 6.

Tabela 5: Análise de Variância (ANOVA), da influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1,19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) sem Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Soma de Quadrados Médios	F	Valor p	resultado
Modelo	3	561010,24	187003,42			
Erro	8	11803,29	1475,41	126,75	<0,0001	Rejeita $H_0$
Total	11	572813,54				

Tabela 6 - Resultados da comparação múltipla de Tukey entre a influência de diferentes concentrações do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no crescimento de osteoblastos da linhagem hFOB1.19, em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) sem Soro Fetal Bovino (SFB), com relação ao crescimento celular.

<b>Concentração (%)</b>	<b>Média do Crescimento Celular (%)</b>
50	666,39 a
25	433,49 c
12,5	191,17 b
6,125	116,18 b

Letras iguais significa que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias.

As análises realizadas permitiram verificar que existe diferença estatística entre as concentrações do grupo experimental com que não recebeu SFB. A concentração que mais contribuiu para o crescimento celular, em média, foi a concentração de 50%. A concentração de 25% teve uma contribuição mediana. A menor contribuição para o crescimento celular foi as concentrações que não tiveram diferença estatística significante, as concentrações de 12,5% e 6,125%.

### **5.1.3 Resultados do experimento comparando os grupos que receberam 10% de SFB e que não receberam SFB.**

As médias dos grupos experimentais com 10% de SFB e sem SFB estão representados no FIG. 4. O crescimento celular aumenta à medida que aumenta a concentração de PRP diluída no meio de cultura, tanto para o experimento que não recebeu SFB como para o que



recebeu 10% de SFB. O crescimento celular é maior sempre nos experimentos que recebeu 10% de SFB, com destaque para 50% de concentração deste grupo que contém um crescimento celular observado entre 675,7% e 824,0% com mediana igual a 695,7%.

A FIG.5 da dispersão *Box-plot* indica a variabilidade de cada nível do grupo de variáveis do conjunto de dados considerados. Os “boxes” coloridos representam 50% dos dados observados; as linhas extremas aos “boxes” representam o valor mínimo e máximo (excluindo os dados extremos); e a linha que corta os “boxes” é representada pela mediana.

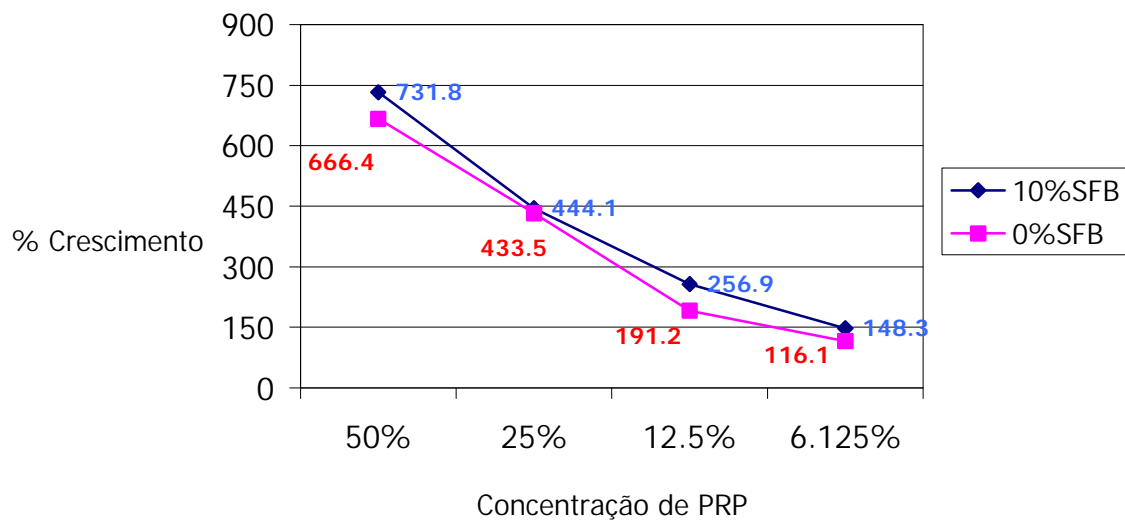


Figura 4 – Influência das diferentes concentrações de Plasma Rico em Plaquetas (PRP), diluído em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de soro fetal bovino (SFB) e sem SFB, com relação ao crescimento celular.

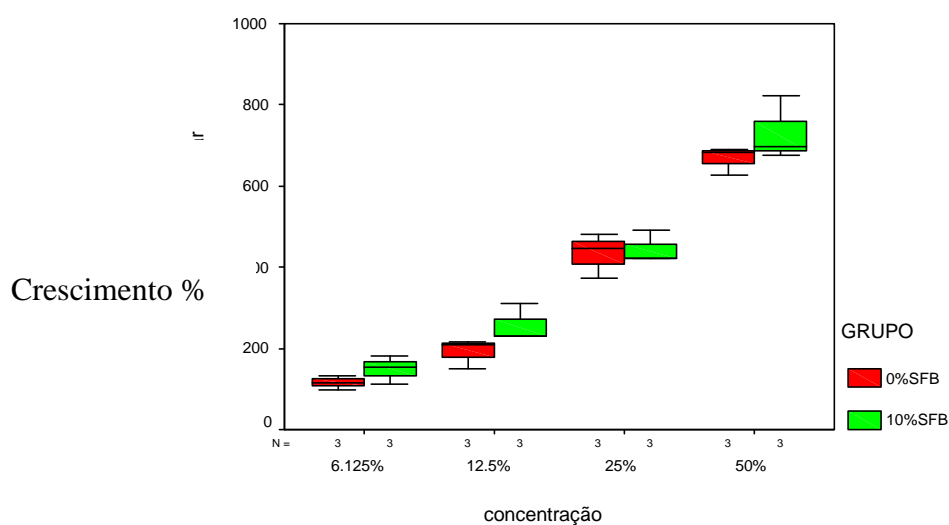


Figura 5 – Dispersão *Box-plot* da dispersão da influência de diferentes concentrações de Plasma Rico em Plaquetas (PRP), diluído em meio de cultura MEM:HAM F-12 (1:1) com 10% de soro fetal bovino (SFB) e sem SFB, com relação ao crescimento celular.

## 5.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA

Os picos de absorvância para o PRP a 6,125% apresentaram-se entre 204,9nm e 378,2nm. Os picos de absorvância para o PRP a 12,5% apresentaram-se entre 220,3 e 293,8nm. Os picos de absorvâncias para o PRP a 25% apresentaram-se entre 464,9 e entre 501,7nm. Os picos de absorvâncias do PRP a 50% apresentaram-se entre 204,9 e 460,2nm e a 601nm. Portanto, o PRP não exerceu influência na leitura realizada a 540nm, visto que, em nenhuma das concentrações utilizadas, detectou-se absorvância a 540nm.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS OSTEOLASTOS

O objetivo desta etapa foi caracterizar morfologicamente os osteoblastos. As imagens permitiram analisar a atividade nuclear e a conformação citoplasmática das células. As imagens foram obtidas estão apresentadas nas FIG. 6 a 8. A imagem representada na FIG. 6 foi obtida num aumento de 100x com 20min de exposição. Esta figura apresenta dois osteoblastos com núcleos celulares ativos, bem definidos e citoplasmas amplo. O osteoblasto da FIG. 7 apresenta um núcleo celular bastante fotossensível (Aumento de 100x com 20s de exposição) mostrando novamente grande atividade celular. O osteoblasto apresentado na FIG. 8 possui morfologia alongada, indicando que o mesmo apresenta-se aderido ao substrato (placa de 24 poços) (Aumento de 40x com 20s de exposição).



Figura 6 – Osteoblastos da linhagem hFOB1.19 com núcleos celulares ativos definidos e citoplasmas amplos (100x, 20s de exposição). Células coradas com DAPI na concentração de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . A visualização foi realizada utilizando-se o microscópio de epifluorescência (Axiostar Plus-Zeiss) com filtros de UV (46 79 60) num pico de excitação da luz de 450 a 500 nm. As fotografias foram feitas usando o filme Kodak Ectacrome ISO 400.



Figura 7 – Osteoblasto da linhagem hFOB1.19 com núcleo celular bastante fotossensível (100x, 20s de exposição). Células coradas com DAPI na concentração de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . A visualização foi realizada utilizando-se o microscópio de epifluorescência (Axiostar Plus-Zeiss) com filtros de UV (46 79 60) num pico de excitação da luz de 450 a 500 nm. As fotografias foram feitas usando o filme Kodak Ectacrome ISO 400.



Figura 8 – Osteoblastos da linhagem hFOB1.19 apresentando morfologia citoplasmática indicativa de adesão celular (40x, 20s de exposição). Células coradas com DAPI na concentração de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . A visualização foi realizada utilizando-se o microscópio de epifluorescência (Axiostar Plus-Zeiss) com filtros de UV (46 79 60) num pico de excitação da luz de 450 a 500 nm. As fotografias foram feitas usando o filme Kodak Ectacrome ISO 400.

## 6 DISCUSSÃO

Existe uma grande dificuldade de cultivo de células da linhagem osteogênica (LIND, 1998). Sabendo da presença de fatores de crescimento no PRP, o estudo proposto neste trabalho utilizou o PRP como suplemento do meio de cultura de osteoblastos humanos da linhagem hFOB1.19, objetivando otimizar a proliferação celular.

Este estudo envolveu uma linhagem celular obtida de um banco de células (ATCC), a qual foi cedida pelo Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, São Paulo. O banco de células permite a distribuição de linhagens celulares padronizadas e caracterizadas, para garantir um depósito seguro para materiais valiosos. Para a aplicação de testes proliferativos ou de citotoxicidade, optou-se por obter as linhagens celulares de bancos de células conhecidos mundialmente, sabendo-se que o controle de qualidade e a caracterização necessária foram realizados.

O cultivo de células do tecido ósseo apresenta certa particularidade. O meio de cultura é diferenciado com componentes específicos para o metabolismo dos osteoblastos. Este meio de cultura é o HAM F-12 (Cultilab, Campinas, São Paulo) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). As células foram mantidas vivas durante a parte experimental do trabalho por meio das passagens (subcultura ou transferência de células de um frasco de cultura para outro) (FRESHNEY, 2000). Verificou-se, no presente trabalho, considerável dificuldade da proliferação celular dos osteoblastos. Este fator pode ser atribuído aos compostos ausentes no

meio de cultura MEM, o qual substituíra o meio de cultura DMEM, indicado para cultivo dos mesmos.

O uso da cultura celular permitiu estudar o comportamento celular fora do corpo humano (HARRISON, 1907; CARREL, 1912; FRESHNEY, 2000). Este estudo abordou o uso do PRP no meio de cultura para testar uma de suas propriedades que é a indução de proliferação celular (SLATER et al., 1995; SANTOS; SANTOS, 2003). O mesmo é bem conhecido pela presença de seus fatores de crescimento (ROSS et al., 1978). O espécime foi obtido de uma voluntária apresentando os exames laboratoriais dentro da normalidade (BASERGA, 1985; KAWASE et al., 2003; LENHARO et al., 2003) para reduzir as interferências externas ao experimento.

A metodologia deste trabalho é concordante com as citações na literatura referentes à grande dificuldade de manutenção da proliferação celular (BIGGERS; WHITTEN; WHITTONGHAM, 1970; WILLIE; KERR; CURRIE, 1980; BASERGA, 1985; RAFF, 1992) sem fatores estimuladores induzindo à apoptose, ou morte celular. Desta forma, foi proposto um modelo de suplementação do meio de cultura como fonte de estímulo proliferativo para os osteoblastos da linhagem hFOB1.19 com o intuito de otimizar a proliferação celular.

Estudos demonstram a grande necessidade de associação de vários fatores de crescimento para a ativação da proliferação celular (GRONTHOS; SIMMONS, 1995; KUZNETSOV; FRIEDENSTEIN; ROBEY, 1997; LIND, 1998; TIAN et al., 1999). Estas sugestões elucidam a importância da suplementação dos meios de cultura com o PRP, o qual apresenta vários fatores de crescimento interagindo de forma a sustentar o processo de proliferação celular. O princípio desta metodologia se apóia em vários estudos revisados (LEDENT; WASTESON; BERLIN, 1995; SLATER et al., 1995; NAKANISHI et al., 1997;

WEIBRICH et al., 2002; KAWASE et al., 2003; LUCARELLI et al., 2003; OKUDA et al., 2003).

Whitman; Berry; Green (1997) descreveram o preparo e o uso do gel de plaquetas, evidenciando a sua característica singular de ser de origem autógena e coletado no período pré-operatório imediato, reduzindo assim o risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas. Esta é uma das propriedades que colocam o plasma rico em plaquetas em primeiro lugar quando se julga a histocompatibilidade dos materiais utilizados nos procedimentos de enxertia óssea, propriedade que nos motivou a conduzir este estudo e registrar a influência do PRP na proliferação de células do tecido ósseo.

O estudo de Ledent; Wasteson; Berlin (1995) indicou que o PRP perde a atividade de seus fatores de crescimento após 4h de sua coleta. Marx et al. (1998) indicaram que a perda da atividade dos fatores de crescimento do PRP iniciaria após 7h de sua coleta. O presente estudo utilizou as plaquetas após aproximadamente 3h da sua coleta sugerindo que o PRP apresentava atividade de seus fatores de crescimento até ser primeiro aplicado no meio de cultura para os osteoblastos.

Os resultados deste estudo estão em concordância com os estudos de Nakanishi et al. (1997) e de Kawase et al. (2003) visto que estes trabalhos indicam o PRP como fonte de estímulo proliferativo para células de origem osteoblástica. O presente estudo mostrou indução na proliferação dos osteoblastos conforme se aumentou a concentração do PRP em meio de cultura, não sendo necessário adicionar SFB no meio para induzir a proliferação dos osteoblastos; estes dados estão em concordância com aqueles obtidos por Lucarelli et al. (2003). O presente estudo mostrou que 50% de PRP suplementado no meio de cultura influenciou melhor a proliferação celular, comparado com Lucarelli et al. (2003), que

obtiveram 10% de PRP como o melhor resultado proliferativo, ao suplementar o meio de cultura para suportar a proliferação celular.

A literatura da fisiologia óssea apresenta casos onde o enxerto ósseo foi associado com o PRP, demonstrando histologicamente a formação de um sistema harvesiano maduro e uma maior formação de osso lamelar comparado com a área enxertada que não recebeu PRP em períodos de 4 a 6 meses (MARX; GARG, 1999). Estudos, *in vitro*, (NAKANISHI et al., 1997; WEIBRICH et al., 2002; GRUBER et al., 2002; KAWASE et al., 2003; OKUDA et al. 2003), demonstram o grande efeito dos fatores de crescimento derivados do PRP na proliferação celular, abrindo novas perspectivas para os tratamentos regenerativos e reparadores na implantodontia.

Os resultados deste e de outros estudos *in vitro* (NAKANISHI et al., 1997; WEIBRICH et al., 2002; LUCARELLI et al., 2003) e *in vivo* (MARX et al., 1998; MARX; GARG, 2003) encorajam pesquisadores e clínicos a continuarem na busca persistente pelo tratamento dos indivíduos portadores de defeitos ósseos estéticos e funcionais, compensando, desta forma, os vários anos de estudo de milhares de pesquisadores em diferentes partes do mundo. Os resultados do presente trabalho contribuem para a base científica do cultivo de células do tecido ósseo e sugere a aplicação do PRP nos procedimentos de enxertia óssea como uma opção promissora.



## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- 1) O efeito na proliferação de osteoblastos hFOB1.19 foi estatisticamente significativo para as concentrações de 50% e 25% de PRP como suplemento no meio de cultura com 10% de SFB ou sem SFB.
- 2) A menor concentração do PRP, responsável por um melhor resultado de proliferação *in vitro* foi determinada como sendo a de 50% de PRP adicionado no meio de cultura com 0% ou 10% de SFB, sugerindo que o PRP é um suplemento promissor na otimização da proliferação de células do tecido ósseo.
- 3) Portanto, não há necessidade de suplementar com SFB o meio de cultura, quando o PRP for adicionado nas concentrações de 50%, 25%, 12,5 ou 6,125%.
- 4) A metodologia do ensaio do MTT envolvendo o PRP gel deve ser modificada.
- 5) Sugere-se que o uso do PRP como adjunto nos procedimentos de enxertia óssea na clínica odontológica é uma estratégia promissora.

## REFERÊNCIAS<sup>ii</sup>

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Disponível em: [www.atcc.org/searchcatalogs/longview:view=ce,639824,CRL-372&text=osteoblasts&max=20](http://www.atcc.org/searchcatalogs/longview:view=ce,639824,CRL-372&text=osteoblasts&max=20). Acesso em: 16 de jan. 2003.

ANITUA E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.14, n.4, p.529-535, 1999.

ANITUA, E.A. **Plasma rich in growth factors**. Vitória: Puesta Al Dia. 2000.

ARMELIN, H.A. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell grown. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.70, p.2702-2706, 1973.

BASERGA, R. **The Biology of Cell Reproduction**. Cambridge: Harvard University. 1985.

BIGGERS, J.D.; WHITTEN, W.K.; WHITTINGHAM, D.G. The culture of mouse embryo *in vitro*. In: DANIEL, j. c (Ed). **Methods in Mammalian Embryology**. San Francisco: Freeman, 1971. p.86-116.

BUSER, D.; RUSKIN, J.; HIGGINBOTTOM, F.; HARDWICK, R.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K.. Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.10, n.6, p.666-681, 1995.

CARLSON, N.E.; ROACH, R.B. Jr. Platelet-rich-plasma: clinical applications in dentistry. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.133, n. 10, p.1383-1386, Oct. 2002.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside the organism. **J. Exp. Med.**, v.15, p.516-528, 1912.

COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein acceleration incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. **J. Biol. Chem.**, v.237, p.1555-1562, 1962.

FRESHNEY, R. I. **Freshney's culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4<sup>th</sup>. ed. New York: Wiley-Liss, 2000, p. 577.

---

<sup>ii</sup> Baseado na NBR 6023: 2002 da ABNT.

FROST, A.; JONSSON, K. B.; BRANDSTROM, H.; LJUNGHALL, S.; NILSSON, O.; LJUNGGREN, O. Interleukin (IL)-13 and IL-4 Inhibit Proliferation and Stimulate IL-6 Formation in Human Osteoblasts: Evidence for Involvement of Receptor Subunits IL-13R, IL-13Ra, and IL-4Ra. **Bone**, v.28, n.3, p.268–274, mar. 2001.

GANIO, C.; TENEWITZ, F. E.; WILSON, R. C.; MOYLES, B. G. The treatment of chronic nonleaking wounds using autologo platelet-derived growth factors. **J. Foot Ankle Surg.**, v.32, n.3, p.263-267, 1993.

GREENE, L.A.; SCHOOTER, E.M. The nerve growth factor: biochemistry, síntesis and mechanism of action. **Ann. Rev. Neurosci**, v.3, p.353-402, 1980.

GRONTHOS, S.; SIMMONS, P. J. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions *in vitro*. **Blood**, v.85, p.929-940, 1995.

GRUBER, R.; VARGA, F.; FISCHER, M. B.; WATZEK, G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. **Clin. Oral Implants Res.**, v.13, n.5, p.529-535, Oct. 2002.

HARRISON, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. **Proc. Soc. Exp.**, v.4, p.140-143, 1907 .

HUANG, W.; RUDKIN, G. H.; CARLSEN, B.; ISHIDA, K.; GHASRI, P.; ANVAR, B.; YAMAGUCHI, D.T.; MILLER, T. A.. Overexpression of BMP-2 modulates morphology, growth, and gene expression in osteoblastic cells. **Exp. Cell Res.**, v.274, p.226-234, 2002.

KASSOLIS, J.D.; ROSEN, P. S.; REYNOLDS, S.A. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. **J. Periodontol.**, v.71, n.10, p.1654-1661, 2000.

KAWASE, T.; OKUDA, K.; WOLFF, L. F.; YOSHIE, H.. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells *in vitro*. **J. Periodontol.**, v.74, n.6, p.856-874, June. 2003.

KNIGHTON, D.R.; CIRESI, K.; FIEGEL, V. D.; SCHUMERTH, S.; BUTLER, E.; CERRA, F. Stimulation of repair in cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. **Surg. Gynecol. Obstet**, v.170, p.56-60, 1990.

KUZNETSOV, S. A.; FRIEDENSTEIN, K.; ROBEY, P. G. Factors required for bone marrow stromal fibroblasts colony formation *in vitro*. **Brit. J. Haematol.**, v.97, p.561-570, Feb. 1997.

LEDENT, E.; WASTESON, A.; BERLIN, G. Growth factor release during preparation and storage of platelet concentrates. **Vox Sang.**, v.64, n.4, p.205-209, 1995.

LENHARO, A.; COSSO, F.; MAGALHÃES, D.; MENEZES, H. H. M. Plasma rico em plaquetas – PRP. In: PONTUAL, M.A.B. e MAGINI, R.S. **Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento**. São Paulo: Santos, 2003. p.165-185.

LIND, M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. **Acta Orthop. Scand. Suppl.**, v.283, p.2-32, Oct. 1998.

LUCARELLI, E.; BECCHERONI, A.; DONATI, D.; SANGIORGI, L.; CENACCHI, A.; DEL VENTO, A. M.; MEOTTI, C.; BERTOJA, A. Z.; GIARDINO, R.; FORNASARI, P. M.; MERCURI, M.; PICCI, P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. **Biomat.**, v.24, p.3095-3100, 2003.

LYNCH, S. E. Interactions of growth factors in tissue repair. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.365, p.341-357. 1991.

MACEDO, A.; FERREIRA, C.F; SOUZA, D.C.; ALDECOA, E.A.; COURA, G.S; CASTRO, K.N.O; PONTUAL, M.A.; MAGINI, R.S.; MAGNANI, O. Protocolo de obtenção e aplicações clínicas do PRP. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. **Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento**. São Paulo: Santos, 2003, p.189-230.

MARX, R. E.; CARLSON, E.R.; EICHSTAEDT, R.M.; SCHIMMELE, S.R.; STRAUSS, J.E.; GEOGERFF, K. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral. Radiol. Endodon.**, v.85, p.638-646, 1998.

MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone graft physiology with use of platelet-rich-plasma and hyperbaric oxygen. In: JENSEN, O.T. et al. **The sinus bone graft**. Colorado: Quintessence, 1999. p.183-189.

MARX, R.E. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich-plasma gel preparation. **J. Oral Maxillofac., Surg.**, v.3, n.58, p.300-301, Mar. 2000.

MARX R.E.; GARG, A.K. Applications of PRP in oral and maxillofacial surgery. Disponível em: <http://perfusionpartners.com/platelegel/geljournall.html> Acesso em: 2 nov. 2003.

MATRAS, H. Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin. **Osterr. Z. Stomatol.**, v.67, n.9, p.338-359, 1970.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunological Methods**, v.65, p.55-63. 1983.

NAKANISHI, H.; YAMANOUCHI, K.; GOTOH, Y.; NAGAYAMA, M. The association of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor tyrosine phosphorylation to mitogenic response of human osteoblastic cells *in vitro*. **Oral. Dis.**, v.3, n.4, p.236-242, Dec. 1997.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Disponível em: [www.nih.gov/news/stemcell/index.htm](http://www.nih.gov/news/stemcell/index.htm). Acesso em: 24 de out. 2002.

NURDEN, P.B. Indirectional trafficking of membrane glycoproteins following platelet activation in suspension. **Tromb. Haemost.**, v.56, n.2, p.63-77, 1977.

OKUDA, K.; KAWASE, T.; MOMOSE, M.; MURATA, M.; SAITO, Y.; SUZUKI, H.; WOLFF, L.F.; YOSHIE, H.. Platelet-rich-plasma contains high levels of PDGF e TGF- $\beta$  and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. **J. Periodontol.**, v.74, n.6, p.849-857, 2003.

PICHE, J.E.; GRAVES, D.T. Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: a comparison with human fibroblasts. **N Y State Dent. J.**, v.68, n.3, p.22-24, Mar. 2002.

RAFF, M.C. Social controls on cell survival and cell death. **Nature**, v.356, p.397-400, 1992.

RAMESH K.V.; RAO, C.M.; BAIRY, K.L.; RAMANARAYAN, K.; KULKARNI, D.R. Effects of procoagulants on wound healing. **Int. J. Exp. Biol.**, v.1, n.28, p.43-45, Jan. 1990.

ROSS, R.; GLOMSET, J.; KARIYA, B.; RAINES, E. Role of platelet factors in the growth of cells in culture. **Natl. Cancer Inst. Monogr.**, v.48, p.103-108, 1978.

SANTOS, M.D; SANTOS, M.D.D. O sangue e a medula óssea. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. **Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento**. São Paulo: Santos. 2003. p.2-44.

SCARSO FILHO, J. **Avaliação do plasma rico em plaquetas na proliferação celular – Estudo “in vitro”**. 2002. 75f. Tese (Doutorado em Odontologia, opção Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SLATER, M.; PATAVA, J.; KINGHAM, K.; MASON, R.S. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. **J. Orthop. Res.**, v.13, n.5, p.655-663, Sept. 1995.

SOGAL, A.; TOFE, A.J. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. **J. Clin. Periodontol.**, v.70, n.9, p.1053-1063, Sep. 1999.

TAYAPONGSAK, P.; O'BRIEN, D.A.; MONTEIRO, C.B.; ARCEO-DIAZ, L.Y. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.52, p.161-165, 1994.

TERUI, S.; SUZUKI, K.; YAKAHASHI, H. Synchronization of chloroplast division in the ultramicroalga *Cysnidoschyzon merolae* (Rhodophyta) by treatment with light and aphidicolin. **J. Phycol.**, v. 31, p. 958-961. 1995.

TIAN, W.; GAO, X.; WANG, D.; CHEN, W. The effects of combined use of multiple growth factors on proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. **Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v.30, n.3, p.271-273, 1999.

TORRICELLI, P.; FINI, M.; BORSARI, V.; LINGER, H.; BERNAUER, J.; TSCHON, M.; BONAZZI, V.; GIARDINO, R. Comparative interspecies investigation on osteoblast cultures: data on cell viability and synthetic activity. **Biomed. Pharmacother.**, v.57, p.57-62, 2003.

VAN GRIENSVEN, M.; ZEICHEN, J.; TSCHERNIG, T.; SEEKAMP, A.; PAPE, H.C. A modified method to culture human osteoblasts from bone tissue specimens using fibrin glue. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v.54, n.1, p.25-29, July 2002.

WEIBRICH, G.; GNOTH, S.H.; OTTO, M.; REICHERT, T.E.; WAGNER, W. Growth stimulation of human osteoblast-like cells by thrombocyte concentrate *in vitro*. **Mund. Kiefer. Gesichtschir.**, v.6, n.3, p.168-174, May 2002.

WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L.; GREEN, D.M. Platelet Gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.55, p.1294-1299, 1997.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Rev. Cytol.**, v.68, p.251-307, 1980.

YU, X.; HSIEH, S.C.; BAO, W.; GRAVES, D.T. Temporal expression of PDGF receptors and PDGF regulatory effects on osteoblastic cells in mineralizing cultures. **Am. J. Physiol.**, v.272, n.5, p.C1709-1716, May 1997.

ZHU, Z.; LEE, C.S.; TEJEDA, K.M.; GIANNOBILE, W.V. Gene transfer and expression of platelet-derived growth factors modulate periodontal cellular activity. **J. Dent. Res.**, v.80, n.3, p.892-897, Mar. 2001.

## GLOSSÁRIO

**Célula Mesenquimal** – Células não-sanguíneas derivadas dos órgãos hematopoiéticos, como da medula óssea ou do fígado do feto, as quais são capazes de sustentar o crescimento de células do sangue, *in vitro*. As células mesenquimais que produzem esta matriz dentro da medula óssea também são derivadas das células tronco mesenquimal (*National Institutes of Health* – Atualização realizada em setembro de 2002).

**Célula Tronco** – Célula com a capacidade de se dividir por períodos indefinidos em cultura e com capacidade de originar células específicas (*National Institutes of Health* – Atualização realizada em setembro de 2002).

**Célula Tronco Mesenquimal** – Células imaturas do tecido conjuntivo embrionário, que podem originar uma série de tipos celulares, incluindo os osteoblastos, células que produzem o tecido ósseo (*National Institutes of Health* – Atualização realizada em setembro de 2002).

**Confluência** - Quando todas as células estão em contato em toda a sua periferia com outras células, não existindo substrato descoberto ou disponível (FRESHNEY, 2000).

**Crescimento em Monocamada** – Crescimento resultando em uma camada de células com uma célula de espessura, cultivada por meio de adesão ao substrato (FRESHNEY, 2000).

**Cultura celular** – Crescimento de células dissociadas do tecido mãe por migração espontânea ou por dispersão mecânica ou enzimática (FRESHNEY, 2000).

**Cultura primária** – Uma cultura iniciada de células, tecido ou órgão removida diretamente de um organismo e antes da primeira subcultura (FRESHNEY, 2000).

**Explante** – Um fragmento de tecido transplantado do seu sítio original e mantido em um meio artificial (FRESHNEY, 2000).

**Linhagem celular contínua** – A capacidade infinita de sobrevivência. Previamente conhecida como “estabelecida” e freqüentemente referida como “imortal” (FRESHNEY, 2000).

**Meio de cultura** – Uma mistura de sais inorgânicos e de outros nutrientes capazes de sustentar a sobrevivência celular, *in vitro*, por 24h. **Meio de crescimento** – Aquele meio utilizado em cultura rotineira de forma que o número de células aumenta com o passar do tempo. **Meio de manutenção** – Um meio de cultura que irá manter a sobrevivência celular sem induzir crescimento (Proliferação celular). Este meio de cultura, apresentando pouco ou nenhum soro, é utilizado para células soro-dependentes para manter a sobrevivência celular sem haver proliferação celular (FRESHNEY, 2000).

**Número da passagem** – O número de vezes em que uma cultura foi subcultivada (FRESHNEY, 2000).

**Passagem** – A transferência de células de um frasco de cultura para outro resultando na subcultura das células. Geralmente, mas não necessariamente, implica na subdivisão de uma população de células em proliferação permitindo a propagação de uma linhagem celular.



**Subconfluência** – As células ocupam aproximadamente 70% da superfície de adesão da garrafa de cultura celular (FRESHNEY, 2000).

**Subcultura** – Veja Passagem.

**Substrato** – Matriz sólida ou semi-sólida subjacente sob a qual cresce uma cultura em monocamada (FRESHNEY, 2000).

